

**Л.Р. Ялалетдинова
В.С. Гордова
С.А. Ястребова
В.Е. Сергеева**

**НЕЙРОИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ
СВОЙСТВА ХОРИОНИЧЕСКОГО
ГОНАДОТРОПИНА**

Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»

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

НЕЙРОИММУНОМОДУЛИРУЮЩИ Е СВОЙСТВА ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

Учебное пособие

Чебоксары
2016

УДК 616.43(075.8) [611.428:616]

ББК 57.15я73

Я51

Рецензенты:

В.П. Балашов – д-р биол. наук, зав. кафедрой гистологии с курсом медицинской биологии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева;

С.В. Диндяев – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой гистологии, цитологии, эмбриологии Ивановской государственной медицинской академии

Ялалетдинова Л.Р.

Я51 Нейроиммуномодулирующие свойства хорионического гонадотропина: учеб. пособие / Л.Р. Ялалетдинова, В.С. Гордова, С.А. Ястребова, В.Е. Сергеева. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2016. – 148 с.

ISBN 978-5-7677-2330-0

Посвящено проблеме нейроэндокринных взаимодействий в тимусе. Дополняет базисные представления современной иммунологии с позиций нейроиммунных взаимодействий при участии нейромедиаторных биогенных аминов в тимусе под воздействием хорионического гонадотропина. После каждой главы приведены вопросы для самопроверки.

Для студентов всех курсов медицинских специальностей, аспирантов, преподавателей гистологии и иммунологии.

Утверждено Учебно-методическим советом университета

Ответственный редактор д-р мед. наук,

профессор В.Н. Диомидова

В учебном пособии представлены фотографии препаратов тимуса из научных архивов В.Е. Сергеевой, Л.Р. Ялалетдиновой, В.С. Гордовой

ISBN 987-5-7677-2330-0

УДК 616.43(075.8) [611.428:616]

ББК 57.15я73

© Издательство Чувашского университета, 2016

© Ялалетдинова Л.Р., Гордова В.С., Ястребова С.А., Сергеева В.Е., 2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Г – гистамин;
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
ДЭС – дисперсная эндокринная система;
ИЛ – интерлейкин;
ИФН – интерферон;
КА – катехоламины;
КВ – корковое вещество долек тимуса;
ЛГ – лютеинизирующий гормон;
ЛГК – люминесцирующие гранулярные клетки;
ЛГК КВ – люминесцирующие гранулярные клетки коркового вещества;
ЛГК между КВ и МВ – люминесцирующие гранулярные клетки между корковым и мозговым веществом долек тимуса;
ЛКВ – лимфоциты коркового вещества долек тимуса;
ЛМВ – лимфоциты мозгового вещества долек тимуса;
МАО – моноаминоксидаза;
МВ – мозговое вещество долек тимуса;
СТ – серотонин;
ТК – тучные клетки;
ТЭК – тимические эпителиальные клетки;
ТТГ – тиреотропный гормон;
ХГ – хорионический гонадотропин;
ФНО – фактор некроза опухолей;
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон;
ЦНС – центральная нервная система;
ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты;
APUD (Amine Precursor Uptake and Lation) – клеточная система поглощения и декарбоксилирования предшественников биоаминов;
Вах – белок, вызывающий апоптоз;
bc1-2 – маркер апоптоза;
CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки;
CD4 – антигенный маркер Т-хелперов;
CD8 – антигенный маркер цитотоксических Т-лимфоцитов;
CD86 – антигенный маркер макрофагов;

Fas (CD95) – мембранный рецептор для Fas-лиганда, относится к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли;

FasL – лиганд (связывающее рецептор вещество) для рецептора Fas, один из внешних факторов, запускающих в клетке апоптоз;

H₁, H₂, H₄ – рецепторы к гистамину;

Ki-67 – маркер пролиферации;

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости;

NK – натуральные киллеры;

NKT – цитотоксические Т-лимфоциты;

p-53 – белок, маркер апоптоза;

TCR – антигенраспознающие рецепторы Т-лимфоцитов;

Th (T helper) – CD4+ Т-лимфоцит;

Th1 – субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов, которая осуществляет регуляцию многих реакций клеточного иммунитета;

Th2 – субпопуляция CD4+ Т-лимфоцитов, которая участвует в активации В-лимфоцитов;

VIP – вазоинтестинальный пептид.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Рабочие программы в целях соответствия Федеральному государственному образовательному стандарту предусматривают самостоятельную работу студентов с соответствующей литературой. Данное учебное пособие призвано оказать посильную помощь в систематизации обширного материала, касающегося нейроиммуноэндокринной регуляции функции главного органа иммунитета – тимуса, поскольку на аудиторных занятиях не представляется возможным уделять должное внимание таким научно-практическим вопросам, как разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии для изучения молекулярных, иммунологических аспектов изучения клеток отдельных органов в норме и при воздействии.

Для того чтобы ясно излагать материал, касающийся процессов, происходящих в тимусе при его адаптации к воздействиям, необходимо сначала получить четкое представление о ключевых моментах этих процессов. Поэтому при работе с данным учебным пособием рекомендуется соблюдать последовательность, в которой располагается материал. Для закрепления материала после каждой главы приведены вопросы, а в конце пособия – тестовые задачи и ключи к ним.

Особенностью этого учебного пособия является то, что его авторы непосредственно принимали участие в исследованиях, результаты которых приводятся в качестве наглядных иллюстраций нейроиммуноэндокринных взаимодействий в тимусе. Изложение построено с учетом многолетнего опыта преподавания на медицинском факультете.

Авторы считают своим долгом выразить благодарность доктору медицинских наук, профессору Дине Семеновне Гордон за всестороннюю поддержку.

ВВЕДЕНИЕ

В середине XX века появились две дисциплины – нейроиммуноморфология и нейроиммунофизиология.

Основателем отечественной научной школы иммунофизиологов является доктор медицинских наук, профессор Елена Андреевна Корнева, ее ученики – сотрудники и руководители крупных отечественных и зарубежных научных центров.

Елена Андреевна Корнева в 1963 г. впервые описала влияние локального повреждения структур гипоталамуса на интенсивность гуморального иммунного ответа на антигены. Эта основополагающая работа послужила фундаментом для дальнейших исследований. Так, были установлены пространственно-временные связи структур мозга, участвующих в механизмах реализации реакций мозга на антигены, и разработана новая концепция организации системы нейрогуморальной регуляции иммунологических процессов. Многоуровневая иерархическая концепция стала основой для развития исследований в области иммунофизиологии с привлечением самых современных физиологических, иммунологических, биохимических и молекулярно-биологических методов. Работами школы Елены Андреевны Корневой была установлена значимая роль нервной системы в регуляции функций костного мозга как источника стволовых кроветворных клеток. Были экспериментально обоснованы ключевые механизмы взаимодействия двух важнейших биорегуляторных систем – нейроэндокринной и иммунной, изучены медиаторы нейроэндокринно-иммунных взаимодействий. Благодаря этим работам стало возможным развитие принципиально нового направления современной медицины.

Одним из первых ученых в мире, работающих в области нейроиммуноморфологии, является доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии естественных наук Российской Федерации, почетный член Национальной академии наук и искусств Чувашской Республики Дина Семеновна Гордон. Она в течение 1968-2000 гг. преподавала в Чувашском государственном университете им. И.Н. Ульянова, 20 лет заведовала кафедрой гистологии и общей биологии медицинского факультета, является основателем «Научной школы

морфологов Чувашии». Впервые профессор Гордон и сотрудники кафедры гистологии и общей биологии с помощью люминесцентно-гистохимических методов показали, что лимфоидные органы, тимус, селезенка, лимфатические узлы имеют адренергическую иннервацию и хорошо обеспечены биогенными аминами – катехоламинами и серотонином.

Нейромедиаторные биогенные амины – обязательные посредники нейроэндокринно-иммунных взаимодействий, и при их участии происходят все приспособительные реакции иммунной системы. Многолетние исследования учеников Дины Семеновны Гордон показали значимость нейромедиаторных биогенных аминов в реакциях адаптации тимуса к фармакологическим (резерпин, адреноблокаторы, серотонин, адреналин, норадреналин), физиологическим (беременность), оперативным (удаление селезенки, яичников, яичек), антигенным (растворимые, корпускулярные, опухолевые, трансплантационные), гормональным (введение соматотропного гормона, адренотропного гормона, хорионического гонадотропина) воздействиям. Методы люминесцентной гистохимии за время их использования в научных исследованиях не потеряли своей значимости, наоборот, они являются хорошим дополнением к современным широкоиспользуемым методам иммуногистохимического анализа.

Данное учебное пособие – лишь краткий экскурс в научно-исследовательскую работу, без которой невозможно представить ни процессы познания, ни процессы обучения, ни практическую деятельность врача. Врачу всегда следует помнить, что в живом организме все взаимосвязано между собой, и отдельно не существует ни нервной, ни эндокринной, ни иммунной систем, а есть одна – нейроиммуноэндокринная, или, как ее еще называют, нейроэндокринноиммунная. Любое изменение со стороны нервного, эндокринного или иммунного компонента непременно отражается на остальных звеньях, что помогает формировать приспособительные реакции как отдельных органов, так и всего организма.

Глава 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Эндокринные железы и их гормоны

Взаимосвязь отдельных частей сложного организма для обеспечения его целостности и приспособления к меняющимся условиям внешней среды осуществляется с помощью специальных регуляторных механизмов, возникших в процессе филогенеза.

Регуляторную роль у простейших выполняют продукты внутриклеточного обмена веществ. Эволюционно позднее для осуществления взаимосвязи между отдельными частями многоклеточных организмов появилась нервная система. У беспозвоночных часть нервных элементов превратилась в нейросекреторные клетки – в клетки, способные вырабатывать и выделять биологически активные вещества. У членистоногих и позвоночных возникли специализированные образования – железы внутренней секреции, выполняющие совместно с нервной системой функцию регуляции деятельности организма. Термин «внутренняя секреция» был предложен в 1885 году французским физиологом К. Бернаром.

Эволюция регуляторных систем, таким образом, осуществлялась в направлении: внутриклеточные регуляторы → нервные клетки → нейросекреторные клетки → эндокринные железы.

У позвоночных работают все указанные регуляторные механизмы, однако ведущая роль в объединении организма в одно целое принадлежит нервной системе. Железы внутренней секреции подчинены нервным влияниям и являются важнейшим составным компонентом общей системы регуляции функций.

Железы внутренней секреции, или эндокринные железы, представляют специализированные органы или группы клеток, основная функция которых заключается в выработке и выделении во внутреннюю среду организма специфических биологически активных веществ.

Взаимодействие нервной и эндокринной систем, а также их влияние на ткани и органы происходит с помощью сигнальных молекул, осуществляющих межклеточные контакты, координа-

цию и регуляцию функций (табл. 1). Таким образом, жизнь каждой клетки происходит в сложном и непрерывном химическом окружении.

Таблица 1

Отличия групп сигнальных молекул

Группа	Биологическая роль
Нейромедиаторы (ацетилхолин, амины: серотонин, катехоламины, гистамин)	Передача информации от нейрона к нейрону и к периферическим органам в синапсах
Нейропептиды (соматостатин, вазопрессин, кальцитонин, окситоцин, вазоактивный интестинальный пептид)	Обратимая регуляция (модуляция) метаболизма нервных клеток и передача возбуждения в синапсах
Гормоны (белки, крупные пептиды, стероиды, производные аминокислот)	Дистантная регуляция процессов в периферических органах и тканях

Особенность эндокринных желез заключается в отсутствии выводных протоков, и этим они отличаются от экзокринных (желез внешней секреции), которые выделяют свои секреты через выводные протоки. Продукты эндокринных желез, называемые гормонами, выделяются непосредственно в просвет кровеносных и лимфатических капилляров, которыми густо оплетены клетки эндокринных желез (табл. 2).

Способностью к внутренней секреции обладают не только специализированные эндокринные железы (гипофиз, щитовидная железа, паращитовидные железы, надпочечники, эпифиз, тимус) и железы смешанной секреции (семенники, яичники, поджелудочная железа), но и отдельные клеточные группы, не объединенные структурно в самостоятельные органы, так называемые клетки ДЭС. Например, в гипоталамусе, помимо нервных элементов, имеются нейросекреторные клетки, синтезирующие либерины и статины, регулирующие деятельность передней и средней долей гипофиза, а также нейрогормоны вазопрессин и окситоцин. В слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта находятся клетки, продуцирующие около десятка гормональных продуктов.

Таблица 2

Эндокринные железы и продуцируемые ими гормоны

Название органа	Гормон
Гипоталамус	Гипоталамические факторы (либерины и статины), нейрогормоны – вазопрессин, окситоцин
Гипофиз: аденогипофиз	Соматотропин, тиреотропин, адренокортикотропин, лютропин, фоллитропин, пролактин, липотропин, меланотропин
Гипофиз: нейрогипофиз	Вазопрессин, окситоцин (синтезируются в гипоталамусе)
Щитовидная железа: фолликулярный эпителий	Тироксин, трийодтиронин
Щитовидная железа: С-клетки	Кальцитонин, катакальцин, кокальцигенин
Паращитовидные железы	Паратгормон
Островки Лангерганса поджелудочной железы	Инсулин, глюкагон, соматостатин, панкреагастрин, секретин, панкреозимин
Надпочечники: кора	Кортикостероиды (минералокортикоиды, глюкокортикоиды, андрогены, эстрогены)
Надпочечники: мозговое вещество	Катехоламины (адреналин, норадреналин)
Половые железы: семенники	Андрогены (тестостерон)
Половые железы: яичники	Эстрогены (прогестерон, эстрадиол, эстрол)
Тимус	Тимозин, тимопозтин, тималин
Эпифиз	Мелатонин, серотонин
Плацента	Эстрогены, релаксин, хорионический прогестерон

В женском организме во время беременности формируется плацента, которая выполняет функции временной эндокринной железы – она продуцирует хорионический гонадотропин и другие гормоны.

Тимус, центральный орган иммунитета, ранее называли вилочковой, или зобной, железой. Это название до сих пор встречается в некоторых литературных источниках. Однако в соответствии с установленными нормативами в «Международных терминах по цитологии и гистологии человека с официальным

списком русских эквивалентов» – официальном издании гистологической терминологии – слово «тимус» не имеет эквивалентов. По этим же нормативам термины «центральные» и «периферические», относительно лимфоидных органов, заменены на «первичные» и «вторичные».

Понятие о нейроиммуноэндокринной системе

Работами школы доктора медицинских наук, профессора Елены Андреевны Корневой была установлена значимая роль нервной системы в регуляции функций костного мозга как источника стволовых кроветворных клеток, из которых развиваются иммунокомпетентные клетки. Были экспериментально обоснованы ключевые механизмы взаимодействия двух важнейших биорегуляторных систем – нейроэндокринной и иммунной, изучены медиаторы нейроэндокринно-иммунных взаимодействий. Благодаря этим работам стало возможным развитие принципиально нового направления современной медицины и разработана новая концепция организации системы нейрогуморальной регуляции иммунологических процессов.

Работы, посвященные иннервации тимуса, проведенные В.Е. Сергеевой и Д.С. Гордон, внесли значительный вклад в формирование представления об открытом синапсе, которым оканчиваются нервные волокна. В результате поступления определенных модулирующих сигналов нервные окончания выделяют нейромедиаторы в непосредственной близости от лимфоидных клеток, и таким образом происходит «доставка» определенных сигналов до иммунокомпетентных клеток.

В тимусе также выявлены нервные волокна, содержащие разнообразные нейропептиды: вазоактивный интестинальный пептид, пептид, родственник кальцитонину, нейропептид Y, субстанция P.

Представление об открытом синапсе позволило выстроить концепцию о цепи реализации взаимодействия между нервной и иммунной системой через нейромедиаторы. Посредством расположенных на мембране рецепторов к нейромедиаторам возможно восприятие этими клетками изменений нейромедиатор-

ного микроокружения. Изменение содержания нейромедиаторов в микроокружении клетки воспринимается рецепторами, расположенными на их мембранах, что отражается на их метаболической и функциональной активности.

Взаимосвязь в тимусе нервных, иммунных и эндокринных компонентов обеспечивает адаптацию иммунной системы организма к гормональным воздействиям, в том числе и к действию хорионического гонадотропина.

Вопросы для закрепления материала

1. Как осуществляется регуляция жизнедеятельности у одноклеточных и многоклеточных организмов?

2. Дайте определение понятию «железы внутренней секреции».

3. Кто впервые предложил термин «внутренняя секреция»?

4. Укажите железы внутренней секреции, способные выполнять внешнесекреторные функции.

5. Чем отличаются между собой нейромедиаторы, нейропептиды и гормоны?

6. Назовите эндокринные железы и укажите основные гормоны, вырабатываемые ими?

7. Назовите временную железу внутренней секреции и гормоны, которые она продуцирует.

8. Назовите ученых, благодаря которым была установлена взаимосвязь нервной и иммунной систем.

9. Как называется официальное издание гистологической терминологии?

Глава 2. ТИМУС

Топография тимуса. Развитие тимуса у человека

Тимус, первичный лимфоидный орган, является центральным органом иммунитета и осуществляет взаимосвязь иммунной и нейроэндокринной систем.

Он находится в переднем средостении, состоит из парных частей, расположенных по бокам трахеи. Верхние отделы, наиболее суженные, называются верхушкой тимуса, нижняя часть, расширенная – основанием. Верхушка тимуса своей задней поверхностью прилегает к трахее, передней – к месту прикрепления грудино-щитовидных мышц (рис. 1). Задняя поверхность остальной части тимуса примыкает к крупным кровеносным сосудам (к верхней полой вене, плечеголовным венам, дуге аорты с отходящими от нее артериями), к перикарду, а края – к медиастинальным плеврам.



Рис. 1. Эндокринные железы
(с изменениями из источника: Синельников Р.Д., Синельников Я.Р., 1996, С. 233)

На начальных стадиях эмбрионального периода тимус представлен эпителиальной закладкой. В 8 недель гестации тимус заполняется стволовыми кроветворными клетками, ко-

торые в дальнейшем дифференцируются в лимфоциты. В тимус мигрируют предшественники из эмбриональной печени и красного костного мозга. Эпителиальные закладки превращаются в сетчатую структуру, в которой располагаются лимфоидные клетки. В тимус внедряются клетки нервного гребня, на основе которых развиваются клетки ДЭС, миоидные клетки, секреторные тимусные эпителиальные клетки. На 8–11-й неделях внутриутробного развития в тимус вырастает мезенхима, появляются дендритные клетки и макрофаги. В мозговом веществе появляются тимусные тельца. В период 14–17-й недель внутриутробного развития в тимусе разграничиваются корковое и мозговое вещество. До пяти месяцев внутриутробного развития в тимусе дифференцируются лимфоциты: $CD4^+$, $CD8^+$ (табл. 3). К шести месяцам тимус формируется окончательно, тимусные эпителиальные клетки секретируют гормоны, нейропептиды.

Таблица 3
Развитие тимуса человека в эмбриогенезе

Этап развития тимуса	Срок реализации, нед.
Начало гемопоэза в желточном мешке	3
Закладка стромы тимуса	6
Заселение тимуса (1-я волна)	8
Появление $\gamma\delta$ -тимоцитов	8,5-10
Вещество долек тимуса начинает разделяться на корковое и мозговое	12
Появление $CD4^+8^+$ $\alpha\beta$ -тимоцитов	10-14
Экспрессия молекул МНС II класса в строме тимуса	14
Появление $CD4^-CD8^+$ и $CD4^+8^+$ тимоцитов	14-20

Строение тимусной дольки. Развитие лимфоцитов в тимусе

Сформированный тимус, окруженный соединительнотканной капсулой, состоит из совокупности долек различной величины. Соединительнотканнные корковые перегородки содержат

мало клеточных элементов и состоят в основном из тонких коллагеновых и эластических волокон.

В каждой дольке выделяют зоны: наружную субкапсулярную, глубокую корковую, кортикомедуллярную, медуллярную и периваскулярную зоны (рис. 2).

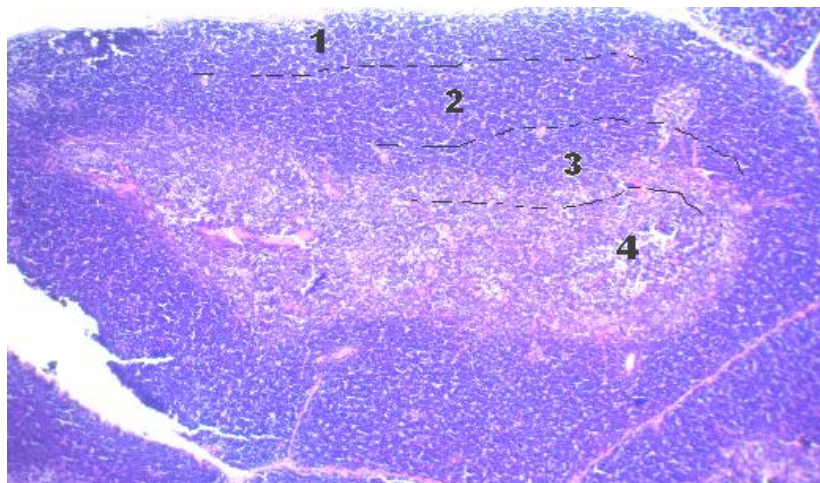


Рис. 2. Долька тимуса. Окраска гематоксилином и эозином:
1– корковое вещество, прилежащее к капсуле (субкапсулярная зона);
2 – глубокое корковое вещество; 3 – граница между корковым и мозговым веществом (кортико-медуллярная зона); 4 – мозговое вещество.
Микроскоп МИКМЕД-1. Об. 10, ок. 10

В корковом веществе выделяют субкапсулярную и глубокую корковую зоны. Субкапсулярная зона занимает $\frac{1}{4}$ толщины коркового слоя. Морфофункциональные особенности субкапсулярной зоны долек тимуса создают условия для предшественников Т-лимфоцитов на начальных этапах их созревания (рис. 3).

Структурный каркас субкапсулярной зоны составляют тимические эпителиальные клетки, в ячейках которых расположены пре-Т-лимфоциты, лимфобласты из красного костного мозга. На них экспрессируется нейропептид субстанция Р.

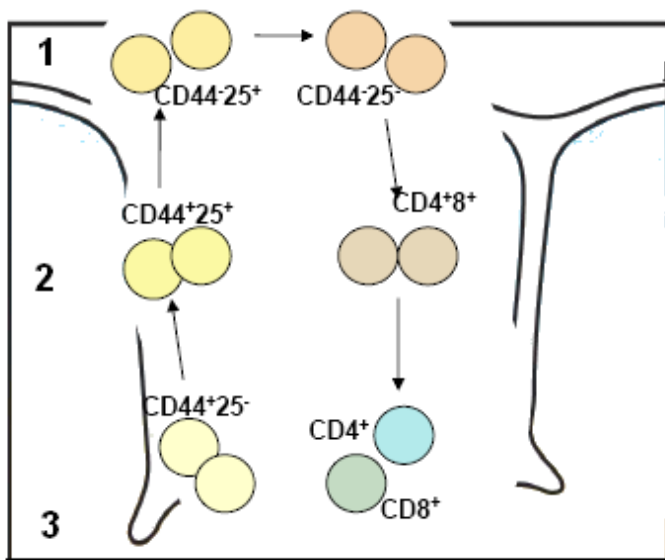


Рис. 3. Миграция лимфоцитов по морфофункциональным зонам дольки тимуса в процессе созревания:

1– корковое вещество, прилежащее к соединительнотканым корковым перегородкам (так называемая субкапсулярная зона); 2 – глубокие слои коркового вещества; 3 – граница между корковым и мозговым веществом (с изменениями, из: Ярилин А.А., 2010)

Тимические эпителиальные клетки – это крупные клетки со множеством отростков. Они подразделяются на секреторные и клетки-«няньки». Каждая клетка-«нянька» может взаимодействовать с тимоцитами, половина из которых находится в периоде митоза клеточного цикла. Субкапсулярные секреторные клетки экспрессируют молекулы адгезии, рецепторы для цитокинов и ростовых факторов, содержат гормоны тимуса (тимулин, α_1 -, β_3 -, β_4 -тимозины, тимопоэтин, тимический сывороточный фактор), хемоаттрактант для пре-Т-лимфоцитов.

В субкапсулярной зоне долек тимуса много крупных лимфобластов, по антигенному составу соответствующих пре-Т-лимфоцитам. Они составляют 0,5-5% всех клеток тимуса. Лимфоциты, взаимодействующие с клетками-«няньками», относятся к ранним тимоцитам, имеют фенотип Т-хелперов, которые не способны продуцировать интерлейкин-2. В субкапсулярной зоне располагаются

также макрофаги, способные секретировать интерлейкин-1, простагландины и осуществлять фагоцитоз.

Внутренняя кортикальная зона долек тимуса состоит из широкопетливой сети эпителиальных клеток, отростки которых соединены десмосомами. Различают участки с относительно густой сетью эпителия и участки, названные резервуарами для тимоцитов, где эпителиальные клетки отсутствуют.

Глубокая корковая зона долек тимуса состоит из сети эпителиальных клеток и их микроокружения: тимоциты, макрофаги, дендритные клетки. Дендритные клетки отличаются отсутствием десмосом и тонофиламентов в цитоплазме. В тимусе секреторные клетки, происходящие из нервного гребня, являются источником нейропептидов (кислый белок глиальных фибрилл, виментин); секреторная активность нейропептидпродуцирующих клеток находится под контролем цитокинов ИЛ-1, ИФН γ . Эпителиальные клетки экспрессируют антигены I и II классов системы МНС. В тимусе на Т-лимфоцитах появляются антигенраспознающие рецепторы (TCR), с помощью которых Т-лимфоциты распознают пептидные фрагменты чужеродных молекул в составе аутологических молекул МНС I и II классов.

Корковое вещество долек тимуса содержит: опорные клетки эпителиального происхождения, которые формируют «каркас» ткани, образуют гематотимусный барьер; звездчатые клетки, секретирующие растворимые тимические гормоны: тимопозтин, тимозин и другие; клетки-«няньки» с инвагинациями, в которых развиваются лимфоциты. В корковом веществе содержатся: созревающие Т-лимфоциты и клетки макрофагального ряда: типичные макрофаги, дендритные и интердигитирующие клетки. Антигенпрезентирующие клетки участвуют в представлении антигенов Т-лимфоцита, дифференцировке лимфоцитов по Th-1 и Th-2 пути.

В корковом веществе долек тимуса преобладают делящиеся Т-лимфоциты. Глубже находятся созревающие Т-лимфоциты, которые постепенно мигрируют к мозговому веществу. Процесс созревания Т-лимфоцитов занимает примерно 20 суток, но тимопозз сохраняется в тимусе на протяжении всего онтогенеза.

Кортикомедуллярная зона долек тимуса с многочисленными макрофагами развивается через одну неделю после рождения, и с этого момента распределение интердигитирующих клеток и макрофагов не отличается от такового в тимусе животных в периоде

половой зрелости. В цитоплазме макрофагов данной зоны много лизосом, положительная реакция на эстеразу. Предполагают, что функциональное значение интердигитирующих клеток состоит в создании определенного микроокружения для тимоцитов тимуса.

С помощью люминесцентно-гистохимических методов сотрудники кафедры гистологии и общей биологии Чувашского государственного университета Д.С. Гордон, В.Е. Сергеева, И.Г. Зеленова (1982) выявили макрофаги особого типа, расположенные исключительно на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса и содержащие внутриклеточное вещество гетерогенного состава, в котором обнаружены частично окисленные ненасыщенные липиды. По мнению авторов, описанные макрофаги участвуют в синтезе и накоплении биогенных аминов, в метаболизме простагландина E. В кортикомедуллярной зоне они обнаружили также аутолюминесцирующие гранулярные клетки, дающие реакцию на комплексно связанные липиды, обозначили их в дидактических целях как «премедуллярные люминесцирующие гранулярные клетки».

В тимусе происходит положительная селекция, поддержка выживания и размножения МНС-специфичных клеток и отрицательная селекция, индукция апоптоза аутоспецифических клонов (рис. 4).

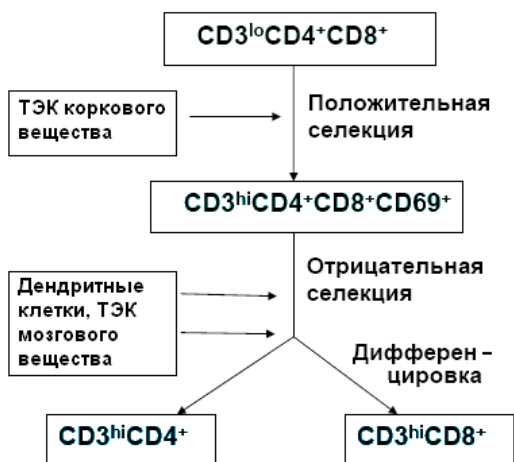


Рис. 4. Селекция и дифференцировка лимфоцитов в тимусе: CD3^{lo} – низкий уровень экспрессии маркера CD3; CD3^{hi} – высокий уровень экспрессии маркера CD3; ТЭК – тимические эпителиальные клетки (с изменениями из: Ярилин А.А., 2010)

Селекция осуществляется путем контактного взаимодействия лимфоцитов с эпителиальными клетками, дендритными клетками, макрофагами. Апоптоз лимфоцитов в тимусе – обычный процесс, которому подвергаются 95% Т-клеток. В условиях активации макрофагов, гипертрофии дендритных клеток негативная селекция ускоряется и охватывает большое число аутореактивных лимфоцитов. Созревшие лимфоциты покидают тимус в кортикомедуллярной области или переходят в мозговое вещество.

Параллельно с тимической селекцией осуществляется разделение тимоцитов на субпопуляции $CD4^+CD8^-$ (Т-хелперов) и $CD4^-CD8^+$ лимфоцитов (ЦТЛ). На тимоцитах, распознающих МНС II класса, сохраняется корецептор CD4, а на клетках, распознающих пептид МНС I класса, располагается корецептор CD8. На юных тимоцитах ($CD4^-CD8^-$) присутствуют рецепторы к вазоинтестинальному пептиду, который подавляет спонтанную и индуцированную пролиферацию тимоцитов, их апоптоз, миграцию. Рецепторы усиливают дифференцировку $CD4^+CD8^-$ клеток.

Клетки, экспрессирующие на своей поверхности пре-TCR-рецептор, не способны связываться с молекулами МНС, для узнавания которых TCR-рецепторам необходимо наличие CD4 и CD8 корецепторов на поверхности тимоцитов. Образование комплекса между пре-TCR-рецептором и CD3-корецептором приводит к ингибированию перестроек генов β субъединицы и в то же время вызывает активацию экспрессии генов CD4 и CD8.

Тимоциты становятся двойными позитивными ($CD4^+CD8^+$), они активно мигрируют в корковое вещество тимуса, где происходит их взаимодействие с клетками кортикального эпителия, экспрессирующими МНС-I и МНС-II. Клетки, не способные взаимодействовать с комплексами МНС кортикального эпителия, подвергаются апоптозу, в то время как клетки, успешно прошедшие такое взаимодействие, начинают активно делиться.

Мозговое вещество долек тимуса состоит из крупных эпителиальных клеток с меньшим количеством Т-лимфоцитов, ден-

дритных клеток, макрофагов, миоэпителиальных клеток по сравнению с корковым веществом. В мозговом веществе эпителиальных клеток в семь раз больше, чем в корковом веществе.

Слоистые эпителиальные тимусные тельца формируются в процессе развития из эпителиальных клеток. В центральной части мозгового вещества расположены тимусные тельца, связанные с адренергическими нервными волокнами. В тимусных тельцах обнаруживается специально меченная постапоптотическая ДНК.

T-лимфоциты мозгового вещества имеют зрелый фенотип $CD4^+CD8^-$ и $CD4^-CD8^+$. В результате гистохимических исследований с применением моноклональных антител обнаружено, что на зрелых лимфоцитах экспрессируется ген предшественника субстанции Р. Возвращаясь в кортикомедуллярную зону, они покидают тимус, пополняя периферический кровоток. Процесс созревания лимфоцитов обусловлен тимическим микроокружением. В тимусе развивается несколько популяций T-лимфоцитов (табл. 5).

Таблица 5

Субпопуляции T-лимфоцитов, развивающиеся в тимусе

Субпопуляция клеток	Количество, %	Характеристика популяции	Особенность селекции
$\gamma\delta$ T-клетки	1	Развиваются в эмбриональном тимусе и в регенерирующем тимусе взрослых	Селекция в тимусе отсутствует
$CD4^+ \alpha\beta$ Th	8-10	Основные субпопуляции, развивающиеся в тимусе взрослых	Подвергаются селекции в тимусе при участии эпителиальных и дендритных клеток
$CD8^+ \alpha\beta$ CTL	5-7		
$CD4^+CD25^+$ Treg	2-4		
$\alpha\beta$ NKT-клетки	2-3	Развиваются в тимусе взрослых	Подвергаются селекции при участии кортикальных тимоцитов

Молекула CD4 является молекулой клеточной адгезии благодаря сродству для молекул МНС-II. Популяция CD4-позитивных Т-лимфоцитов включает Т-хелперы (помогающие развитию иммунных реакций) и Т-индукторы (активирующие другие типы лимфоцитов). CD4-позитивные клетки запускают активационные процессы в клетках макрофагального ряда.

Т-хелперы подразделяют на две субпопуляции. Th1 продуцируют цитокины ИЛ-2, γ -ИФН, β -ФНО, ИЛ-3 и регулируют реакции клеточного иммунитета, в то время как Th2 вырабатывают ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13 и участвуют в реакциях гуморального иммунитета. При различных состояниях дифференцировка CD4⁺ Т-лимфоцитов изменяется.

CD8 – акцессорная молекула лимфоцитов, состоящая из дисульфидсвязанного гетеродимера двух гликопротеинов – CD8 α - и β -цепей – или гомодимера CD8 α -цепей. CD8, являясь молекулой клеточной адгезии, связывается с неполиморфным иммуноглобулинподобным $\alpha 3$ -доменом молекул МНС-I. CD8-позитивная субпопуляция Т-лимфоцитов состоит из ЦТЛ, выполняющих эффекторную, киллерную функцию, и Т-регуляторных лимфоцитов, регулирующих иммунный ответ. ЦТЛ обладают способностью специфически разрушать чужеродные клетки, опухолевые клетки или клетки, пораженные вирусами. Популяция CD8 α ⁺ Т-лимфоцитов обеспечивает овуляторные процессы в яичниках.

В дольках тимуса выявляются также эпителиальные каналцы, которые выявляются редко, но при воздействии различных факторов на организм каналцы могут стать облигатными образованиями тимуса. Они легко определяются без применения специальных методов исследования. По строению эпителиальные каналцы разделяют на две группы: 1) стенки их образованы одним слоем эпителиоцитов с высокой секреторной активностью; 2) стенки образованы многослойным эпителием.

Вопросы для закрепления материала

1. Где располагается тимус?
2. Охарактеризуйте макроморфологическое строение тимуса.

3. Укажите основные морфо-функциональные зоны в дольках тимуса.
4. Назовите основные этапы развития тимуса в эмбриогенезе.
5. На каком сроке внутриутробного развития закладывается тимус?
6. На каком сроке внутриутробного развития в дольках тимуса появляется корковое и мозговое вещество?
7. Охарактеризуйте корковое вещество долек тимуса, прилежащее к капсуле.
8. Какие особенности есть у тимических эпителиальных клеток?
9. Охарактеризуйте глубокую корковую зону долек тимуса.
10. Охарактеризуйте кортико-медуллярную зону долек тимуса.
11. Что представляют собой «премедуллярные люминесцирующие гранулярные клетки»?
12. Как осуществляется миграция лимфоцитов по морфо-функциональным зонам дольки тимуса в процессе созревания?
13. Как осуществляется разделение тимоцитов на субпопуляции?
14. Охарактеризуйте субпопуляции Т-лимфоцитов, развивающиеся в тимусе.
15. В каких морфо-функциональных зонах тимуса встречаются «двойные негативные» тимоциты?
16. В каких морфо-функциональных зонах тимуса встречаются «двойные позитивные» тимоциты?
17. Назовите основные свойства клеток, экспрессирующих молекулу CD4.
18. Назовите основные свойства клеток, экспрессирующих молекулу CD8.
19. При участии каких клеток происходит положительная селекция?
20. При участии каких клеток происходит отрицательная селекция?

Значение апоптоза в развитии лимфоцитов

Важным механизмом иммунной регуляции является апоптоз. Развитие клеток иммунной системы невозможно без постоянного участия апоптоза, роль которого подробно изучена в различных стадиях дифференцировки лимфоцитов.

Апоптоз – основной механизм выбраковки клеток с дефектами перестройки генов антигенраспознающих рецепторов. Свыше 97% лимфоцитов погибает в тимусе в результате селекции: при положительной селекции погибают лимфоциты, неспособные распознавать собственные антигены, при отрицательной селекции с помощью апоптоза происходит выбраковка аутоагрессивных клонов (тех, которые воспринимают собственные антигены как чужеродные).

При дифференцировке субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов апоптозу подвергаются клетки в случае несоответствия их костимулирующих молекул (CD4 и CD8).

Клетки, выполнившие свою функцию в иммунном ответе, также подвергаются апоптозу.

Гибель клеток обеспечивается двумя видами морфологических изменений, которые соответствуют различным механизмам ее развития, – некрозом и апоптозом.

Некроз возникает под действием повреждающих факторов (перегревание, переохлаждение, недостаток кислорода, нарушение кровоснабжения, механические травмы и т. п.).

При некрозе происходит разрушение клеточных структур после выделения гидролаз и других ферментов из поврежденных лизосом, кариопикноз, кариорексис и кариолизис ядра, исчезновение клеточных границ и распад клетки.

Апоптоз – физиологическая (запрограммированная) гибель клеток. Это активный энергоемкий генетически контролируемый процесс, регулируемый внутренней программой, которая запускается внешними факторами.

При апоптозе клетка теряет все специализированные структуры на своей поверхности, такие как микроворсинки и межклеточные соединения, происходит уплотнение цитоплазмы и ядра. Конденсация цитоплазмы приводит ко все более компактному

расположению органелл, которые в отличие от некроза сохраняют свою целостность. Изменения в ядре включают только кариопикноз и кариорексис (без разрушения кариолеммы), кариолизис отсутствует; хроматин в ядре укладывается в виде крупных полулуний, после чего ядро распадается на фрагменты. Плазмолемма клетки образует многочисленные вздутия и выпячивания, содержащие органеллы и фрагменты ядра, которые отшнуровываются, формируя округлые или овальные апоптотические тельца.

Апоптоз – один из фундаментальных и универсальных механизмов тканевого гомеостаза, который наблюдается в различных тканях человека и животных в норме, патологии, эмбриональном развитии и у взрослого.

Ключевые отличия апоптоза от некроза заключаются в том, что процесс апоптоза начинается с дезорганизации хроматина и фрагментации ядра – клетка распадается на апоптотические тельца, которые впоследствии фагоцитируются макрофагами.

В случае апоптоза гибель клетки не приводит к воспалению, и на окружающие клетки практически не влияет.

Ключевым моментом при некрозе является увеличение проницаемости мембраны, которая затем разрывается, высвобождая из клетки активные внутриклеточные ферменты, которые закисляют среду. Таким образом, при некрозе возникает воспаление.

Гибель лимфоцитов при апоптозе – важный механизм регуляции в иммунной системе и средство поддержания иммунного гомеостаза в организме (рис. 5).

В развитии апоптоза выделяют три стадии: индукторную, эффекторную и стадию дегградации.

Индукторная стадия характеризуется рецепцией сигнала и начальными этапами его передачи. Механизмы рецепции подразделяются на рецепторные (когда внешние факторы действуют на специализированные мембранные рецепторы) и митохондриальные (при активации внутриклеточных сигналов).

В эффекторной стадии происходит активизация каспаз, которая вызывает в клетке необратимые изменения.

В стадии дегградации реализуются механизмы гибели клетки.

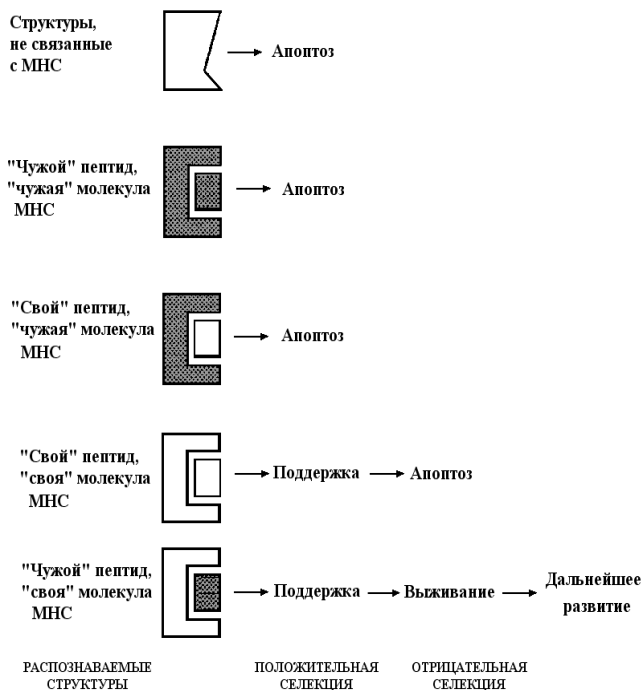


Рис. 5. Гибель лимфоцитов при апоптозе.

Заштрихованы символические изображения распознаваемых молекул МНС и пептидов, отличающихся от аутологических («своих»); изображения «своих» молекул не заштрихованы (адаптировано из: Ярилин А.А., 1999. С. 43)

Апоптоз вносит вклад в реакции клеток на внешние воздействия и осуществление иммунной защиты. В регуляции апоптоза принимают участие проапоптотические факторы, которые ускоряют апоптоз, и антиапоптотические факторы, которые препятствуют апоптозу.

К проапоптотическим факторам относят цитохром С, р53, APF-1, AIF, Bcl-10, Bax, Bak и другие, к антиапоптотическим – Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, FLIP и другие.

Клетки могут приобрести устойчивость к апоптозу путем усиленной экспрессии антиапоптотических факторов или в результате мутаций в генах проапоптотических молекул. Одним из

главных ингибиторов апоптоза является белок bcl-2, который обнаружен во многих типах нормальных клеток, особенно его экспрессия высока в долгоживущих клетках, таких как нейроны, стволовые, хрящевые клетки, клетках иммунной памяти и т.д.

Локализуясь на наружной мембране митохондрий, bcl-2 стабилизирует мембрану и предупреждает выход факторов, индуцирующих апоптоз. Основным механизмом регуляции апоптоза с участием белка bcl-2 заключается в контроле высвобождения цитохрома С из митохондрий за счет изменения проницаемости мембраны.

Важную роль в процессах апоптоза играет ядерный белок р53 – фактор транскрипции, который регулирует клеточный цикл и активирует белки, участвующие в репарации поврежденной ДНК. Если поврежденную ДНК восстановить невозможно, белок р53 запускает процесс апоптоза. Выделяют «дикий» и мутантный типы р-53. «Дикий» тип р-53 образуется в интактных клетках, длительно не существует, иммуногистохимически не выявляется. Мутантный белок р-53 инактивирует «дикий» р-53 и стимулирует опухолевый рост. При накоплении р-53 в ядре стимулируется апоптоз. Белки апоптоза влияют на вазопрес-синергические нейроны гипоталамуса.

Повышение скорости клеточной пролиферации в корковом веществе долики тимуса происходит при инволюции тимуса, вызванной спленэктомией, причем данный процесс сопровождается увеличением экспрессии белков-регуляторов апоптоза bcl-2 и р-53.

Процессы апоптоза и пролиферации являются основными механизмами, контролирующими иммунный гомеостаз. На эти процессы влияют гормоны и нейромедиаторы. Катехоламины влияют на пролиферацию лимфоцитов Th1 и Th2.

Катехоламины сокращают пролиферативную активность клеток, подавляют их способность продуцировать ИЛ-4, ИФН- γ . Катехоламинзависимый процесс апоптоза Т- и В-лимфоцитов запускается посредством индукции bcl-2/Bax и Fas/FasL.

Адреналин влияет на клетки крови разнонаправленно: он индуцирует апоптоз мононуклеаров, но тормозит апоптоз гранулоцитов. Адреналин, осуществляющий α -адренергическую стимуляцию, вызывает апоптоз мононуклеаров за счет цитоки-

нов, оказывающих β -адреноблокаду, bcl-2. Баланс цитокинов изменяется при стимуляции β -адренергических рецепторов. Катеcholамины могут подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов.

Для выявления белков, регулирующих апоптоз, широко применяется иммуноферментный метод с использованием моно- и поликлональных антител к интересующим исследователей белкам (см. раздел 4.4).

Вопросы для закрепления материала

1. Что такое апоптоз
2. В чем смысл апоптоза?
3. Что такое некроз?
4. В чем смысл некроза?
5. Чем морфологические изменения клетки отличаются при апоптозе и при некрозе?
6. Охарактеризуйте стадии апоптоза.
7. Какие белки принимают участие в регуляции апоптоза?
8. Где расположен белок bcl-2?
9. В чем заключаются функции белка bcl-2?
10. Где расположен белок p-53?
11. В чем заключаются функции белка p-53?
12. В чем заключается роль апоптоза в развитии клеток иммунной системы?

Кровоснабжение тимуса. Гематотимический барьер

Тимус обильно кровоснабжается ветвями, отходящими от внутренней грудной перикардиодиафрагмальной, верхней и нижней щитовидных артерий. Внутри тимуса артерии ветвятся на междольковые и внутридольковые, формируют дуговые ветви. Кровеносные капилляры образуют густую сеть, хорошо развитую в корковом веществе долек тимуса (рис. 6).

Капилляры в корковом веществе долек окружены непрерывной базальной мембраной и слоем эпителиальных клеток, что способствует ограничению перикапиллярного пространства. Пространство вокруг капилляров, в котором встречаются лимфоциты и макрофаги, заполнено тканевой жидкостью.

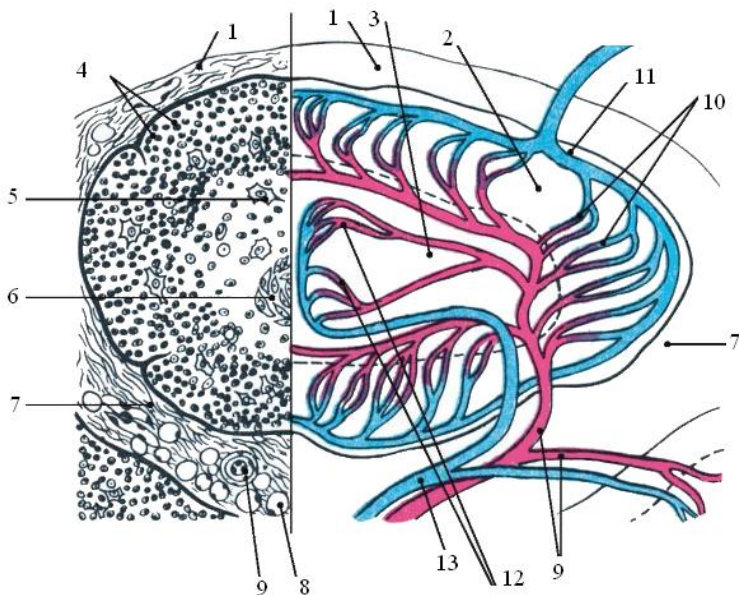


Рис. 6. Строение и кровоснабжение дольки тимуса:

1 – соединительнотканная капсула, 2 – корковое вещество, 3 – мозговое вещество дольки, 4 – лимфоциты, 5 – эпителиоретикулциты, 6 – слоистое тельце, 7 – междольковая волокнистая соединительная ткань, 8 – адипоцит, 9 – междольковая артерия, 10 – капиллярная сеть коркового вещества, 11 – подкапсулярная вена, 12 – капиллярная сеть мозгового вещества, 13 – междольковая вена (источник: Афанасьев Ю.И. и др., 2002)

Капилляры коркового вещества долек тимуса переходят непосредственно в подкапсулярные венулы. Меньшая часть идет в мозговое вещество долек, где на границе с корковым веществом долек переходит в посткапиллярные венулы, отличительной особенностью которых от капсулярных венул является наличие высокого призматического эндотелия.

С помощью эндотелиальной выстилки могут рециркулировать (уходить из тимуса и вновь возвращаться) Т-лимфоциты. Таким образом, отток крови из коркового и мозгового вещества происходит раздельно.

В корковом веществе долек между сосудистым руслом и эпителиальным пространством тимуса имеет место гематотими-

ческий барьер, в составе которого эндотелий капилляра, внутридольковое периваскулярное пространство, базальная мембрана эпителиоретикулярных клеток. В корковом веществе эпителиальные клетки формируют сплошной слой, что обеспечивает избирательное проникновение претимоцитов через гематотимический барьер. В мозговом слое гематотимический барьер имеет фенестрированные капилляры (см. рис. 7).

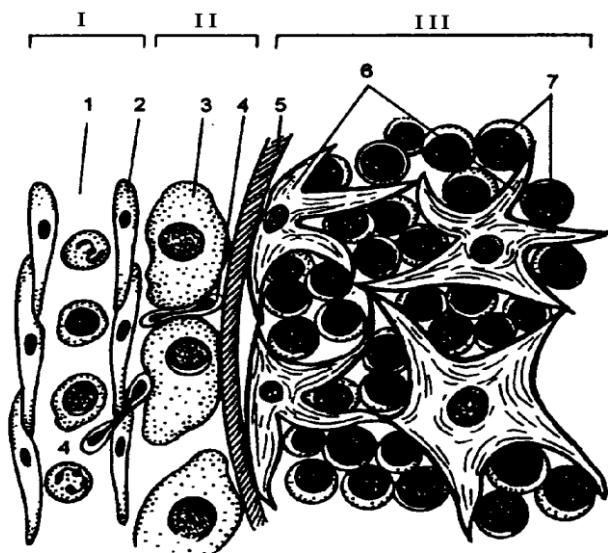


Рис. 7. Гематотимический барьер:

I – кровеносный сосуд; II – периваскулярное пространство; III – «эпителиальное» («внутреннее») пространство тимуса; 1 – сосуд; 2 – эндотелиальная клетка; 3 – макрофаг; 4 – мигрирующие лимфоидные клетки; 5 – базальная мембрана; 6 – эпителиальные клетки; 7 – тимоциты (источник: Ярилин А.А., 1999)

Гематотимический барьер препятствует свободному обмену клетками и макромолекулами между кровью и корковым веществом тимуса, обеспечивая избирательное проникновение в орган предшественников тимоцитов и ограниченного набора других клеток, например имеющих моноцитарно-макрофагальное происхождение. Вопрос о наличии барьера между кровью и

мозговым веществом долек тимуса остается дискуссионным. В этой части тимуса не исключен свободный обмен клетками и макромолекулами между кровью и тимусом.

Лимфатическая система тимуса представлена глубокой (паренхиматозной) и поверхностной (капсулярной и подкапсулярной) выносящей сетью капилляров. Адвентициальная оболочка вен без перерыва переходит в адвентицию лимфатических сосудов. Паренхиматозная капиллярная сеть хорошо развита в корковом веществе, а в мозговом капилляры обнаружены вокруг эпителиальных слоистых тимусных телец. Лимфатические капилляры идут вдоль кровеносных сосудов и собираются в сосуды междольковых перегородок. Важную роль во взаимодействии кровеносных и лимфатических сосудов, регуляции кровотока и лимфооттока играют тучные клетки, способные к синтезу, накоплению и выведению нейромедиаторных биогенных аминов: гистамина, серотонина, катехоловых аминов.

Вопросы для закрепления материала

1. Какими артериями кровоснабжается тимус?
2. Как распределяются кровеносные сосуды по корковому веществу долек тимуса?
3. Как распределяются кровеносные сосуды по мозговому веществу долек тимуса?
4. Благодаря каким структурам в тимусе возможна рециркуляция Т-лимфоцитов?
5. Что такое гематотимический барьер?
6. Укажите составляющие гематотимического барьера.
7. В чем заключается функция гематотимического барьера?
8. Чем представлена лимфатическая система тимуса?
9. Почему вопрос о наличии барьера между кровью и мозговым веществом долек тимуса остается дискуссионным?
10. Укажите особенности гематотимического барьера в мозговом веществе долек тимуса.

Глава 3. НЕРВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТИМУСА

Иннервация тимуса.

Способы выявления нервных волокон

Формирование нервного аппарата тимуса происходит одновременно с его внутриутробным развитием. Вростание самых первых нервных волокон в тимус наблюдается у плодов человека четырех лунных месяцев. Нервные проводники проникают в тимус на границе верхней и средней третей в виде одного, реже – двух более крупных нервных стволиков. Во второй половине беременности ветвление нервных волокон в тимусе плода гораздо богаче. Значительно нарастает число варикозных расширений по ходу нервных волокон. К моменту рождения интраорганный нервный аппарат тимуса отличается значительным полиморфизмом: наряду со сформировавшимися рецепторами имеются нервные элементы с эмбриональным характером ветвления (цит. по: Гордон Д.С. и соавт., 1982).

Согласно атласу анатомии Р.Д. Синельникова и Я.Р. Синельникова (1996), тимус иннервируется ветвями блуждающего нерва, от грудного сплетения, в образовании которого принимают участие ветви четырех нижних шейных спинномозговых нервов и трех шейных симпатических узлов. К капсуле тимуса подходят стволики от диафрагмальных нервов и от шейных петель. Симпатические нервные волокна тимуса исходят из шейных симпатических ганглиев. Холинергические волокна отходят от блуждающего, возвратного и диафрагмального нервов.

Норадренергические нервные волокна осуществляют нейрохимическую модуляцию иммунореактивности, т.е. непосредственное взаимодействие нервной и иммунной систем.

Норадренергические нервные волокна расположены в корковом и мозговом веществе долек тимуса. Адренергические нервные волокна с сосудами формируют сплетения. Нервные терминали с четкими варикозными расширениями проникают в тимус по кровеносным сосудам, образуя нервно-сосудистые сплетения. По ходу нервных волокон обнаруживаются тучные клетки (рис. 8).

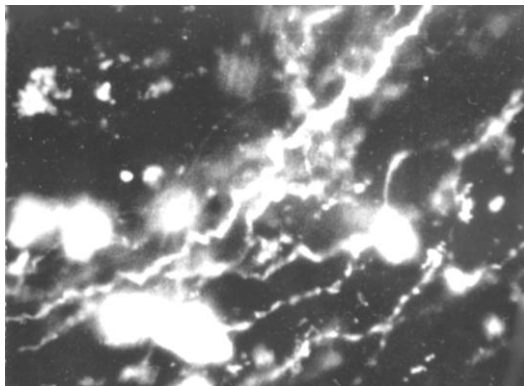


Рис. 8. Адренергические нервные волокна в тимусе.
Метод Фалька-Хилларпа. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Увеличение $\times 900$

Симпатическая нервная система играет значительную роль в развитии и функционировании тимуса. Адренергическая стимуляция подавляет пролиферацию тимоцитов, усиливает экспрессию маркеров клеточной дифференцировки.

Холинергические нервы формируют тонкие, варикозно утолщенные волокна. Холинергические волокна входят в тимус в адвентиции сосудов. Парасимпатическая нервная система и ее медиатор – ацетилхолин – регулируют иммунные реакции. Ацетилхолин стимулирует биосинтез антител и пролиферацию лимфоидных клеток при антигенных воздействиях.

В тимусе описаны нервные волокна, содержащие нейропептиды: вазоактивный интестинальный пептид, пептид, родственный кальцитонину, нейропептид Y, субстанция P. На границе между корковым и мозговым веществом долек тимуса расположены VIP-содержащие структуры и клетки, содержащие еще один нейропептид – субстанцию P.

Детальное изучение иннервации тимуса, не только экстраорганной иннервации, но и распределение нервных волокон и их окончаний внутри органа стало возможным благодаря гистохимическим методам исследования, выявляющим нейромедиаторы.

Окраска метиленовым синим по Шабдашу

Способность окрашивания нервных элементов метиленовым синим зависит от гликолиза, идущего в нервном волокне. Гликолиз идет в определенном оптимальном диапазоне рН, для чего используются фосфатные буферные смеси Зеренсена (рН от 5,8 до 8,2) или ацетатный буфер (от 3,72 до 5,9). При окраске срезов тимуса метиленовым синим с использованием буферной смеси Зеренсена можно выявить крупные нервные стволы и одиночные гладкие, толстые нервные волокна без варикозных утолщений (рис. 9).

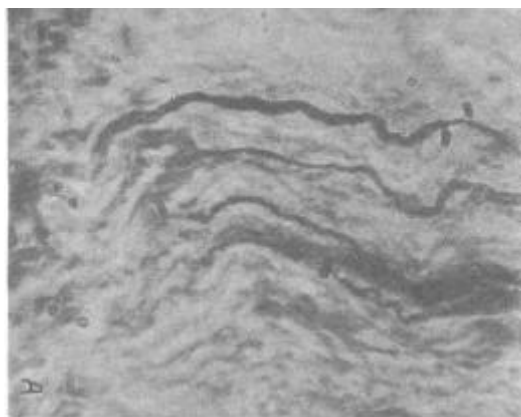


Рис. 9. Мякотные волокна в междольковых соединительнотканых перегородках тимуса. Окраска метиленовым синим, рН 8.05. Об. 40, ок. 10 (источник: Гордон Д.С. и соавт., 1982)

Метиленовый синий освобождают от примеси азура с помощью многократной перекристаллизации. При витально-суправитальной окраске заранее приготовленный и подогретый до 37 °С раствор метиленового синего вводят в левый желудочек сердца животного, находившегося под глубоким эфирным наркозом. Затем небольшие кусочки органа вырезают и помещают на час в термостат при температуре 37 °С на стеклянную вату для докрасивания. После фиксации, окраски и промывки готовят срезы толщиной 30-45 микрон на замораживающем микротоме.

Срезы докрашивают квасцовым кармином Гренахера для контрастирования ядер лимфоцитов, затем проводят через несколько порций абсолютного спирта и заключают в полистирол.

Люминесцентно-гистохимические методы

Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа применяется для выявления в структурах тимуса биогенных аминов: катехоламинов и серотонина.

Криостатные срезы тимуса инкубируют в камере в парах формальдегида в течение 60 минут при температуре 80 °С. Люминесцентный метод основан на реакции моноаминов с формальдегидом, в ходе которой образуются флуоресцирующие соединения. При этом происходит цепь химических реакций, в результате которых с начала катехоламины превращаются в 6,7-диокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин и 4,6,7-триокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, а затем в процессе дегидрогенизации из них образуются флуоресцирующие соединения – 3,4-дигидроизохинолины.

При просмотривании препаратов под люминесцентным микроскопом с использованием запирающегося фильтра низкие концентрации флуоресцирующих соединений визуализируются изумрудно-зеленым цветом, высокие – желтым цветом. Карболины, которые в данных реакциях образуются из серотонина, дают желтое свечение. При проведении модифицированной люминесцентно-гистохимической методики высушивание срезов осуществляется в воздушной среде, что исключает деструкцию тканей. Микроскопия препаратов тимуса производится под люминесцентным микроскопом при длине возбуждающего света 360 нм.

Люминесцентно-гистохимический метод Фалька позволяет выявить не только густые сплетения адренергических нервных волокон как в корковом, так и в мозговом веществе долек тимуса, но и другие структуры тимуса, содержащие катехоламины, в том числе тучные клетки и макрофаги (рис. 10, 11, 12).

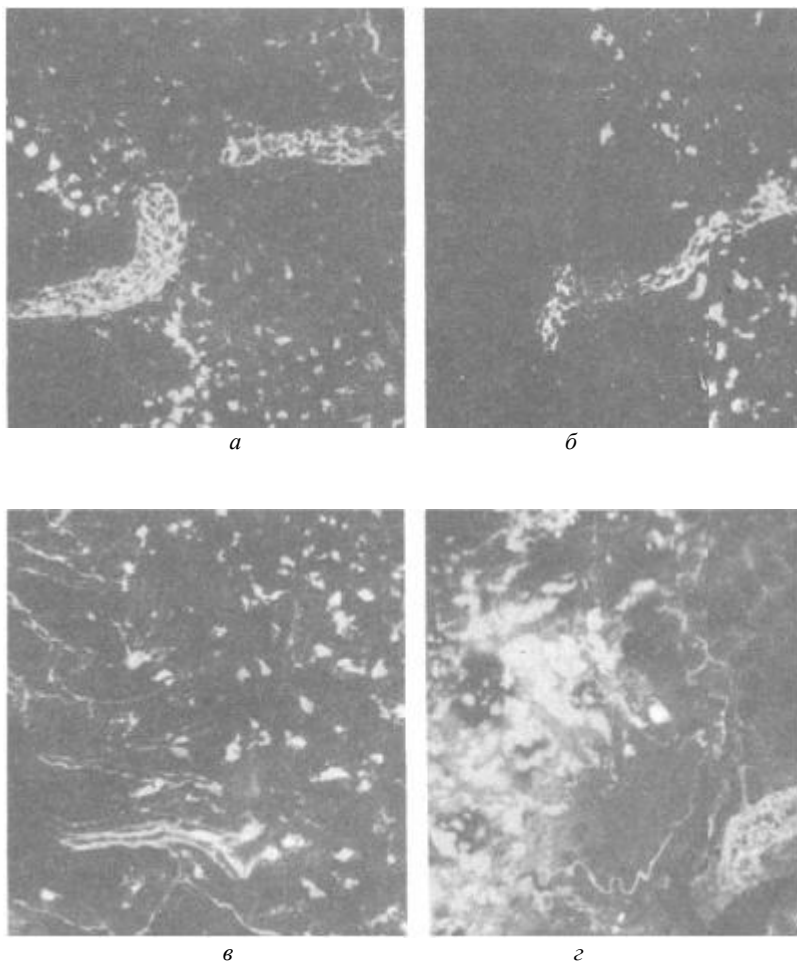


Рис. 10. Адренергическая иннервация паренхимы тимуса. Нервные терминалы среди люминесцирующих клеток коркового вещества: *а, б* – нервно-сосудистое сплетение на границе коркового и мозгового вещества долики тимуса; *в, г* – одиночные нервные терминалы среди люминесцирующих гранулярных клеток коркового вещества долики тимуса. Метод Фалька. МЛ-2. Об. 20, ок. гомаль 1,7 (источник: Гордон Д.С. и соавт., 1982)

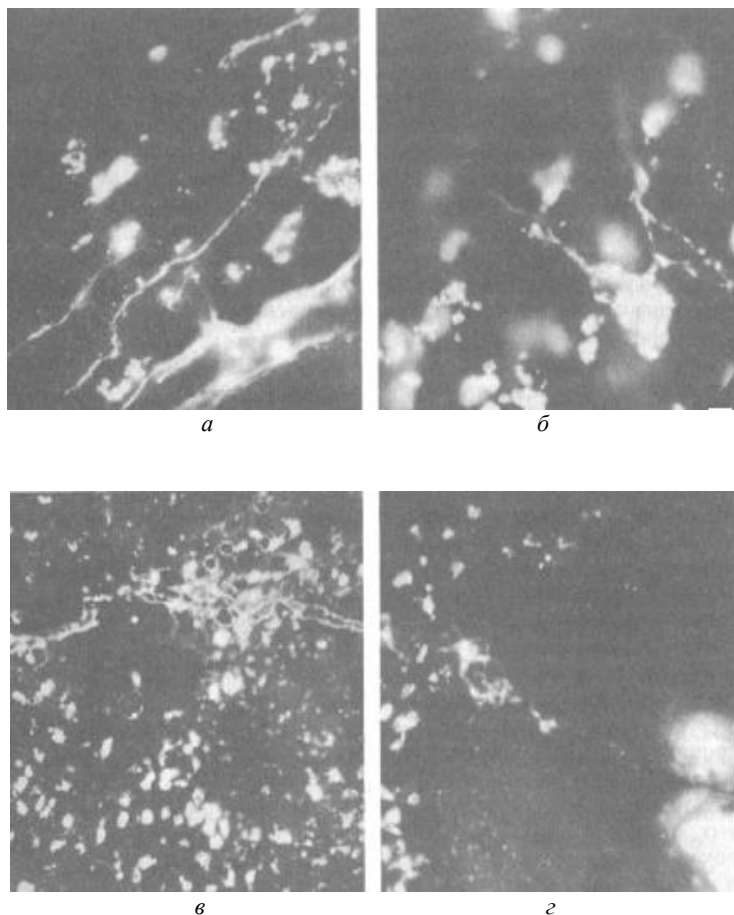


Рис. 11. Адренергическая иннервация паренхимы тимуса:
а, б – нервные волокна, расположенные среди люминесцирующих клеток; *в* – одиночные нервные терминалы на границе коркового и мозгового вещества дольки тимуса; *г* – одиночные нервные терминалы, подходящие в мозговом веществе долек к тимусным тельцам. Метод Фалька. МЛ-2. *а, б* – Об. 90. *б, в* – Об. 20. ок. гомаль 1,7 (источник: Гордон Д.С. и соавт., 1982)

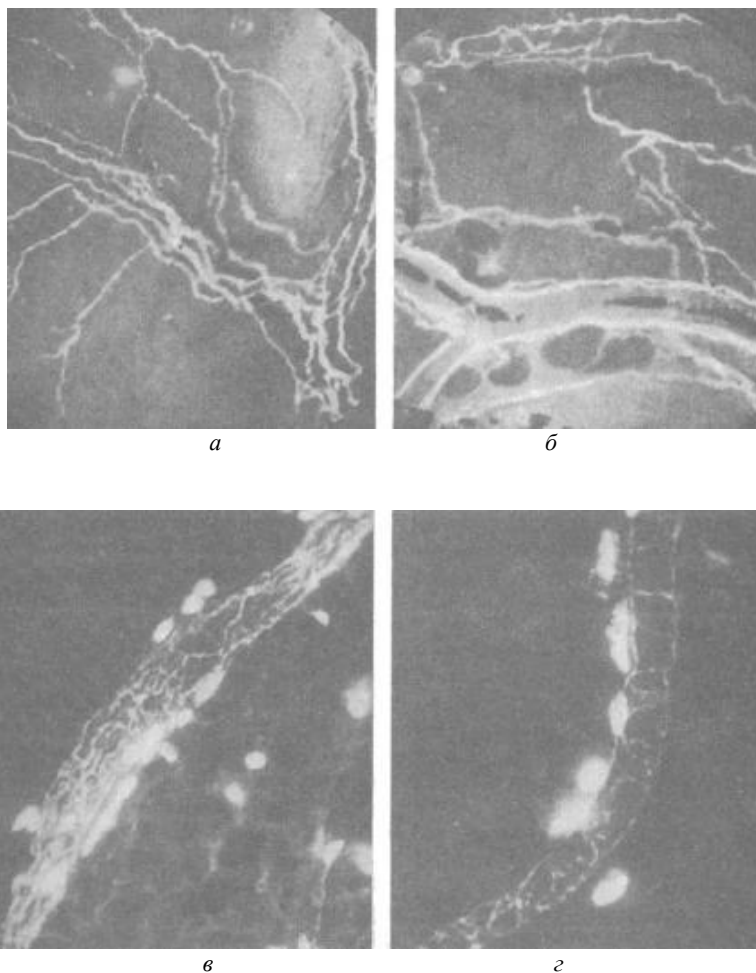


Рис. 12. Адренергическая иннервация паренхимы тимуса:
а, б – кровеносные сосуды, оплетенные нервными волокнами;
в, г – располагающиеся по ходу кровеносных сосудов тучные клетки.
 Метод Фалька. МЛ-2. Об. 90, ок. гомаль 1,7 (источник: Гордон Д.С. и соавт., 1982)

Тучные клетки, которые находятся около сосудов, выделяют медиаторы (гистамин, серотонин и др.), регулирующие сосудистую проницаемость. Так тучные клетки в тимусе облегчают

контакт и переход стволовых клеток и лимфоцитов при рециркуляции и миграции образовавшихся тимоцитов.

Необходимо заметить, что тучные клетки располагаются не только около адренергических, но и около холинергических нервных волокон, оплетающих сосуды (рис. 13).

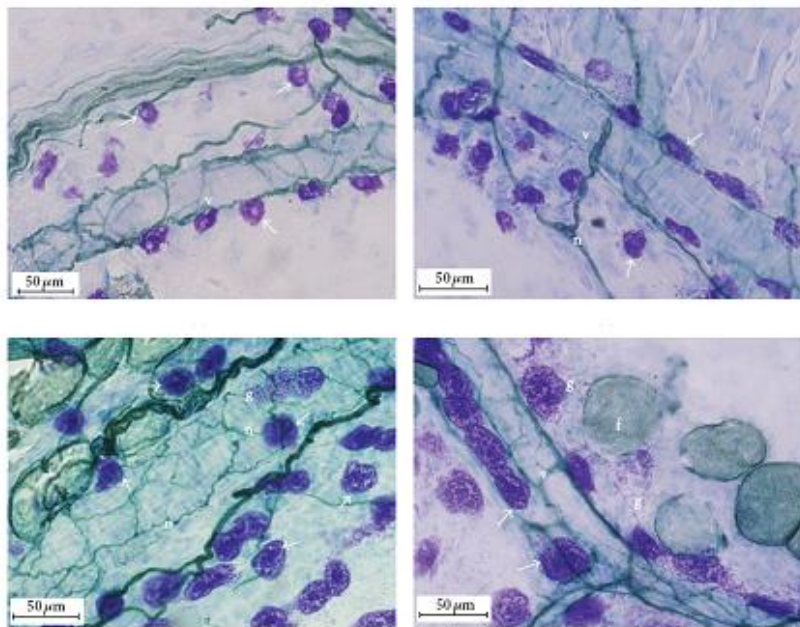


Рис. 13. Кровеносные сосуды, оплетенные холинергическими нервными волокнами с располагающимися по их ходу тучными клетками. Докраска тучных клеток толуидиновым синим (источник: Mingfu L. et al., 2013)

Таким образом, в тимусе описаны адренергические и холинергические нервные волокна. Адренергические нервы, имеющие значительное распространение, проникают в долики тимуса, выделяют нейромедиаторы в окружение макрофагов, дендритных и тучных клеток, лимфоцитов коркового и мозгового вещества долек тимуса. Нейроамины, доставляемые в тимус, играют роль в развитии структур тимуса, регулируют пролифе-

рацию Т-лимфоцитов, апоптоз клеток тимуса, определяют экспрессию на клетках маркеров дифференцировки.

Выявить нервные волокна можно также при помощи непрямого метода иммуногистохимии с применением антител к синаптофизину (Гусельникова В.И. и соавт., 2013).

Монография, посвященная нейромедиаторам лимфоидных органов (Гордон Д.С. Сергеева В.Е., Зеленова И.Г., 1982), подкрепила положение о взаимодействии нейромедиаторов с клетками лимфоидной ткани и внесла значительный вклад в формирование представления об открытом синапсе, которым оканчиваются нервные волокна.

В результате поступления определенных модулирующих сигналов нервные окончания выделяют нейромедиаторы в непосредственной близости от лимфоидных клеток. Таким образом происходит «доставка» определенных сигналов до иммунокомпетентных клеток.

Представление об открытом синапсе позволило выстроить концепцию о цепи реализации взаимодействия между нервной и иммунной системой через нейромедиаторы. Посредством расположенных на мембране рецепторов к нейромедиаторам возможно восприятие этими клетками изменений нейромедиаторного микроокружения.

Изменение содержания нейромедиаторов в микроокружении клетки воспринимается рецепторами, расположенными на мембранах, что отражается на метаболической и функциональной активности этой клетки (Корнева Е.А. и соавт., 2012).

Таким образом, в тимусе наличествует взаимодействие нервной и иммунной систем в обеспечении взаимодействия организма со средой и поддержании постоянства его внутренней среды.

Вопросы для закрепления материала

1. Какими ветвями какого нервного сплетения иннервируется тимус?
2. Принимают ли участие в иннервации тимуса нервы, ядра которых находятся в головном мозге?
3. Укажите нервы, осуществляющие симпатическую иннервацию тимуса.

4. Укажите нервы, осуществляющие парасимпатическую иннервацию тимуса.

5. Какие клеточные элементы располагаются в дольках тимуса рядом с нервными волокнами?

6. Какие методы позволяют выявить адренергические нервные волокна в тимусе?

7. Какие методы позволяют выявить холинергические нервные волокна в тимусе?

8. Что выявляет метод окраски метиленовым синим?

9. Что выявляет метод Фалька?

10. Как осуществляется постановка реакции по методу Фалька?

11. Чем отличаются методы люминесцентной гистохимии от гистохимических методов?

12. Существует ли связь между нервными волокнами и тучными клетками?

13. Какие нервные волокна сопровождаются тучными клетками?

14. Дайте обоснование расположения тучных клеток в непосредственной близости с нервными волокнами.

15. Какие нейромедиаторы связывают тучные клетки и нервные волокна?

16. Какие еще методы, кроме указанных в данном разделе, помогают выявить нервные волокна?

Взаимодействие нервной и иммунной систем

Взаимодействие нервной и иммунной систем происходит во всех органах, в которых есть компоненты этих систем, в том числе и в тимусе (рис. 14).

Иммунная система, активированная антигеном, регулирует активность ЦНС посредством высвобождения цитокинов, которые связываются с рецепторами, локализованными на нервных окончаниях блуждающего нерва, симпатических нервных терминалах, а также непосредственно внутри ЦНС и в области гемато-энцефалического барьера. В свою очередь ЦНС общается с иммунной системой путем активации симпатических нерв-

ных волокон и гипоталамо-гипофизарной системы и надпочечников, в результате которой высвобождаются трансммиттеры: норадреналин и кортикостероидный гормон.



Рис. 14. Пути, осуществляющие двустороннюю коммуникацию между нервной и иммунной системами:

МФ – макрофаг, ДК – дендритная клетка, В – В-лимфоцит, Т – Т-лимфоцит (адаптировано из источника: Kin N.V. et al., 2006)

На лимфоцитах есть рецепторы, которые связывают норадреналин и кортикостероидный гормон, что обеспечивает механизм активации этими лигандами внутриклеточных сигнальных путей, которые регулируют уровень активности иммунной клетки.

Симпатические нервные волокна пронизывают паренхиму тимуса и других лимфоидных органов. Норадреналин высвобождается из нервных терминалей и связывается с адренорецепторами, расположенными на мембранах лимфоцитов: В-лимфоцитов, наивных CD4-лимфоцитов, и Т-хелперов первого типа. Симпатические нервные терминали также высвобождают нейропептид Y, опиоидные пептиды и аденозин, которые принимают участие в активации клеток иммунной системы (рис. 15).

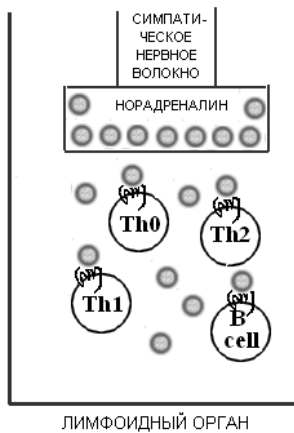


Рис. 15. Симпатический нерв высвобождает норадреналин в микроокружение Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в лимфоидных органах (адаптировано из Kin N.V. et al., 2006)

Двусторонняя коммуникация между нервной и иммунной системами нужна для поддержания гомеостаза, обладая достаточной пластичностью в увеличении или уменьшении активности иммунных клеток. Изменения, затрагивающие любую часть этой системы, так или иначе отражаются на иммунном гомеостазе.

Катехоловые амины

Катехоловые амины (норадреналин, адреналин, дофамин) – это биогенные амины, участвующие в межклеточных взаимодействиях. Синтезируются катехоламины в мозговом веществе надпочечников, головном мозге, везикулах нервных окончаний. Норадреналин синтезируется в перикарионах, в аксонах адренергических нервов создается запас нейромедиатора (рис. 16).

Катехоламины транспортируются к синаптической мембране, но могут синтезироваться и в везикулах нейронов. Исследование биохимии катехоламинов показало, что их синтез осуществляется из тирозина через образование 3-, 4-диоксифенилаланина (ДОФА), на заключительном этапе образуется норадреналин и далее – адреналин (рис. 17). Европейские ученые используют названия «адреналин» и «норадреналин», в то время как американские – «эпинефрин» и «норэпинефрин».

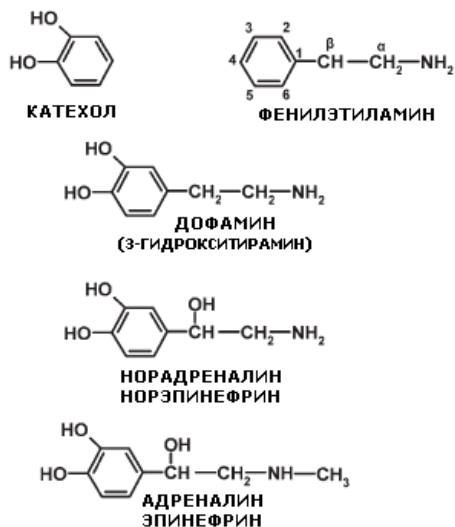


Рис. 16. Структура главных катехоламинов млекопитающих. Основным компонентом является фенилэтиламин. Цифрами обозначены атомы углеродов кольца, буквами – углероды боковой цепи

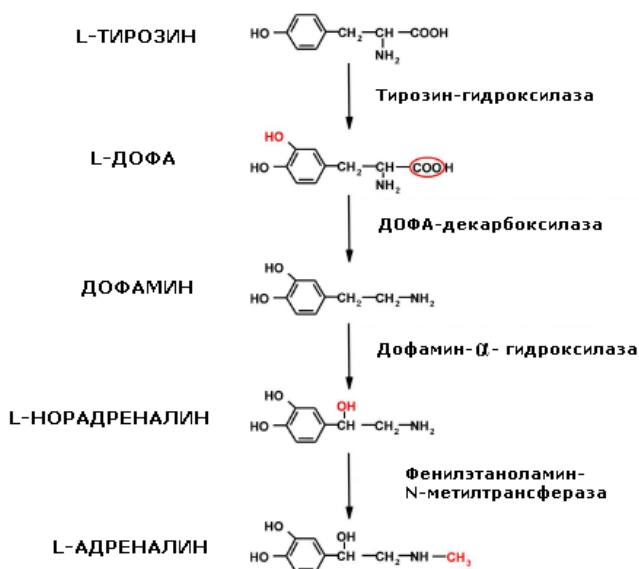


Рис. 17. Биосинтез катехоламинов

Катехоламины, вырабатываемые в цитоплазме нервной клетки, выполняют функции нейромедиатора, амины, вырабатываемые в мозговом веществе надпочечников, – функции гормонов. Норадреналин в адренергических нервах может находиться в двух состояниях: химически связанном (накапливается внутри гранул) и лабильном. Передачу нервного импульса осуществляет амин, находящийся в лабильной форме. Под влиянием нервного импульса происходит высвобождение медиатора в синаптическую щель, в которой амин связывается с постсинаптическими α , β -адренорецепторами, расположенными в цитомембране. Инактивация катехоламинов происходит следующими способами: при помощи MAO осуществляются процессы окислительного дезаминирования, при помощи катехоламин-о-метилтрансферазы запускается метилирование, а также хиноидным окислением, ацетилированием.

С помощью люминесцентно-гистохимических методов при ряде воздействий обнаружено, что норадреналин, адреналин и серотонин находятся в конкурентных биохимических взаимоотношениях, высвобождая друг друга из мест хранения. Изменение содержания нейромедиаторов в микроокружении лимфоидных клеток воспринимается рецепторами, расположенными на их мембранах, что отражается на функциональной и метаболической активности лимфоцитов.

Катехоламины участвуют в иммунных реакциях, развитие которых связано как с активацией фагоцитоза, так и с непосредственным воздействием на лимфоциты через α - и β -адренорецепторы.

Нейромедиаторные системы влияют на иммунные процессы в организме. При первичной сенсibilизации крыс человеческим гамма-глобулином зарегистрировано резкое возрастание количества катехоламинсодержащих клеток в премедулярной зоне долек тимуса. При введении крысам эритроцитов барана отмечается снижение уровня катехоламинов, повышение содержания серотонина. При вторичном иммунном ответе катехоламинпродуцирующая функция клеток иммунокомпетентных органов не подавлялась, отмечался высокий уровень нейромедиатора, в процессе эксперимента наблюдалась тенденция к повышению содержания катехоловых аминов. При дофаминовой ак-

тивации увеличивается число CD4+ Т-лимфоцитов в костном мозге, уменьшается количество CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в тимусе и селезенке. В ряде работ показано, что норадреналин регулирует лимфопоэз. Под влиянием катехоламинов усиливается фагоцитарная активность макрофагов и увеличивается количество Т-хелперов в крови.

В нормальных условиях содержание норадреналина в крови в четыре раза больше, чем адреналина, однако при нейроэндокринной патологии яичников наблюдается одинаковое содержание нейромедиаторов. Повышенная активность симпатической системы с накоплением катехоламинов в крови приводит к нарушению функции репродуктивной системы, нейроэндокринным синдромам.

Для выявления катехоловых аминов в различных клетках и тканях применяются люминесцентно-гистохимические и иммуногистохимические методы (см. раздел «Способы выявления нервных волокон»).

Серотонин

В 1947 г. было открыто вещество, обладающее вазоконстрикторными свойствами, названное серотонином (от *serum* – сыворотка и *vasotonic* – вазотонический).

Серотонин (5-окситриптамиин) принадлежит к группе индолалкиламинов и образуется в результате биотрансформации триптофана с помощью фермента триптофан-5-гидроксилазы в специализированных клетках желудочно-кишечного тракта, костного мозга, центральной нервной системы (рис. 18).

Накопление медиатора происходит в энтерохромаффинных клетках, тромбоцитах, тучных клетках. Серотонин выполняет ведущую роль в иммунологических процессах, происходящих в организме, и является иммуномодулятором. Рецепторы к серотонину разделяются на виды: М-, D-, Т-рецепторы. В последние годы выделены подтипы серотониновых Т-рецепторов: 5-НТ-, 5-НТ₁-, 5-НТ₂-.

При активации серотонинергической системы биоамин соединяется с рецептором, расположенным на мембране, что приводит к активации синтеза цГМФ через внутриклеточный меха-

низм. Инактивация серотонина осуществляется ферментативным путем при помощи фермента моноаминоксидазы и неферментативными путями при соединении его с фосфолипидами и мукополисахаридами, а также с помощью обратного поглощения его пресинаптической мембраной.

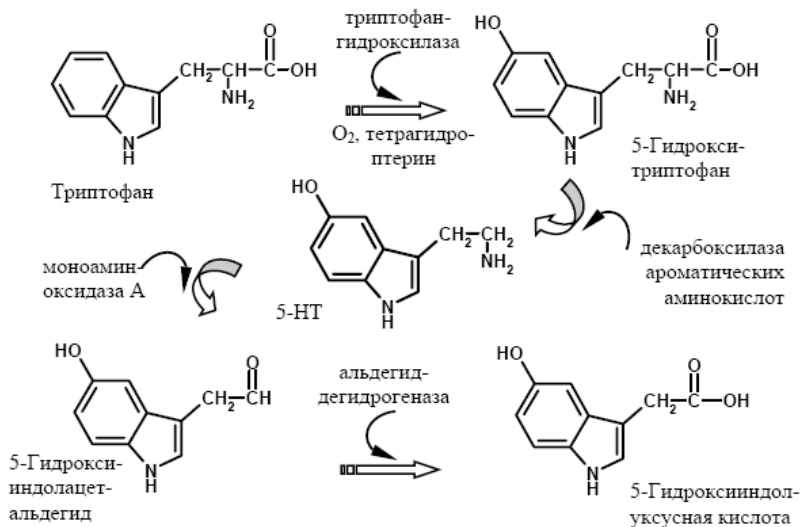


Рис. 18. Метаболизм серотонина (источник: Сидоров А.В., 2008)

Фермент моноаминоксидаза, обеспечивающий инактивацию большей части серотонина, локализуется на внешних мембранах митохондрий и катализирует реакцию окисления серотонина в 5-оксииндолальдегид с освобождением аммиака. В метаболизме серотонина принимают участие цитохром С и цитохромоксидаза, церуллоплазмин. Промежуточным продуктом обмена серотонина является мелатонин.

Серотонин проникает в геном, депрессирует строго определенные участки ДНК, стимулируя их кодировать синтез веществ, пригодных играть роль настоящего носителя именно этого амина. Наличие серотонина в ядрах лимфоцитоподобных предшественников и в ядрах малых сафранинофильных зернистых тучных клеток зарегистрировано гистохимической аргентаффинной реакцией Массона-Фонтаны на серотонин и в люминесцентно-гистохимической реакции Фалька на моноамины.

При изучении свойств серотонина выявлен широкий спектр воздействий на иммунологические процессы (рис. 19).

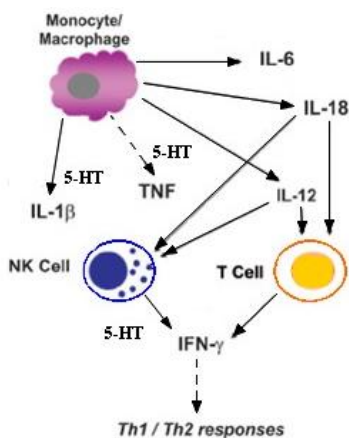


Рис. 19. Роль серотонина в кооперации между макрофагами и лимфоцитами:

5-HT – серотонин. Выделенная стрелка – усиление синтеза, прерывистая стрелка – снижение синтеза (с изменениями из: Tayağani I. C., Changeux J.-P., 2007)

В результате экспериментов обнаружено, что гистамин оказывает влияние на активность структур тимуса, вызывая в малых дозах пролиферацию лимфоцитов в мозговом веществе тимусных долек, увеличивает число тимусных телец, способствует появлению плазматических клеток в премедуллярной зоне.

Серотонин вытесняет норадреналин из тканевых резервов, что показывает конкурентные взаимоотношения медиаторов, подавляет захват норадреналина нервными окончаниями и кровяными пластинками. При контакте организма с антигеном серотонин вызывает угнетение первичного иммунного ответа, нарушение формирования иммунной памяти, уменьшение числа иммунокомпетентных клеток в тканях и органах. В экспериментах с трансплантацией сердца доказана супрессия иммунного ответа при введении 5-окситриптамина – предшественника серотонина. Аналогичные изменения под влиянием серотонина происходят в функционировании антителообразующих клеток.

Серотонин оказывает стимулирующее влияние на НК-клетки (натуральные киллеры) у старых крыс-самок. В развитии аллергического статуса организма лежит недостаточность серотонин-продуцирующей функции клеток ДЭС в иммунокомпетентных органах. Так, В.Е. Сергеева, Д.С. Гордон (1992), изучая серотонинсодержащие клетки в тимусе, пришли к выводу, что люминесцирующие гранулярные клетки, обнаруженные при помощи люминесцентно-гистохимической методики, выявляющей серотонин, относятся к клеткам ДЭС и некоторая их часть обладает свойствами макрофагов. В тимусе фракционным центрифугированием с помощью моноклональных антител к мелатонину выделены клетки ДЭС.

При антигенных воздействиях в организме резко угнетается серотонинпродуцирующая активность клеток в органах иммунитета. В ходе первичного иммунного ответа и в тимусе, и в селезенке снижалось среднее количество клеток, содержащих серотонин. При вторичном иммунном ответе количество серотонинсодержащих клеток вновь возрастало, причем в тимусе такое увеличение даже превышало исходные показатели. При вторичном иммунном ответе, когда возникает необходимость ограничения иммунной реакции, количество клеток, продуцирующих соматотропный гормон, снижается, а количество мелатонинпродуцирующих апудоцитов возрастает.

Известно, что серотонин способен подавлять развитие иммунного ответа за счет избирательной активации Т- и В-лимфоцитов.

В тимусе выявлены клетки, иммунореактивные к серотонину, мелатонину, соматотропному гормону.

В плазме иммунизированных растворимым антигеном крыс при повторном контакте в течение 30 минут с антигеном в плазме выявлено повышенное содержание серотонина в плазме. Отмечены биохимические и морфологические сдвиги с ранних минут антигенных воздействий. Уровень серотонина в плазме возрастает в несколько раз уже через минуту после введения антигена, возвращаясь к норме в течение последующих 4-5 минут. Наблюдаются изменения в клетках, депонирующих серотонин. Введение сенсibilизированным крысам антигена вызывает изменения в перитонеальных тучных клетках, являющихся депо серотонина. Изменения при антигенных воздействиях имеют сходства с реакциями, возникающими при истощении запасов серотонина.

Снижение уровня активности серотонинергической системы в центральной нервной системе, как и введение агонистов дофамина, вызывает стимуляцию иммуногенеза у крыс. Стимуляция иммунологических процессов является дофаминзависимой и осуществляется через тимус, угнетение иммуногенеза серотонином осуществляется через надпочечники.

При введении ингибиторов моноаминоксидазы повышается уровень серотонина в центральной нервной системе, от чего падает свободная диффузия серотонина и увеличивается содержание серотонина в пулах. Снижение синтеза серотонина связано с активацией дофаминергической системы.

Серотонин реализует свое иммунодепрессивное действие через систему гипоталамус–гипофиз–надпочечники. В экспериментах с адреналэктомией установлена стимуляция иммуногенеза, которая связана с активацией миграции стволовых клеток из костного мозга и усилением функции Т-хелперов. Изучение в динамике содержания серотонина при физиологической беременности у мышей показало преобладание серотонина в отличие от катехоламинов в люминесцирующих гранулярных клетках коркового и мозгового вещества долек тимуса. Изучение распределения серотонина в тимусе выявило наличие высоких концентраций амина в тучных клетках и очень низкие концентрации его в микроокружении тучных клеток.

При серотониновом подавлении иммунной реакции на введение эритроцитов барана увеличивается число $CD8^+$ лимфоцитов-супрессоров в костном мозге, снижение $CD4^+$ лимфоцитов-хелперов в тимусе, селезенке, лимфатических узлах. Сведений о влиянии серотонина на процессы апоптоза в тимусе в доступной литературе не обнаружено, однако установлено, что серотонин ингибирует развитие раннего апоптоза лейкоцитов крови.

Механизмы связи между центральными нейромедиаторными структурами и яичниками подробно изучены В.Н. Бабичевым (1995), с маткой – С.В. Диндяевым (2008).

Таким образом, серотонин осуществляет внутриорганный контроль иммунных реакций в центральных органах иммунитета, поддерживает оптимальное соотношение различных субпопуляций лимфоидных клеток. Серотонин регулирует пролиферативную активность эпителиальных, эндотелиальных и лимфоидных клеток.

Помимо люминесцентно-гистохимического метода Фалька серотонин можно выявить с помощью гистохимического метода Массона-Фонтаны. Однако в настоящее время самыми распространенными методами являются иммуно-гистохимические, которые позволяют выявить на поверхности клеток определенные типы серотониновых рецепторов.

Гистамин

Гистамин образуется в результате декарбоксилирования аминокислоты L-гистидина под действием L-гистидин-декарбоксилазы (рис. 20, 21). Ее активность служит лимитирующим фактором накопления гистамина в тканях. Время полураспада синтезированного нейронами гистамина составляет около 30 минут.

Гистамин 2-(4-имидазолил) этиламин присутствует во всех тканях организма, преобладает в метакромагических гранулах тучных клеток и базофилов. Он является важнейшим медиатором анафилактических реакций. Иммунологические эффекты гистамина подтверждены в экспериментах с введением антигенов. При первичном иммунном ответе количество гистаминсодержащих клеток селезенки возрастает примерно в 2 раза, а при вторичном иммунном ответе количество клеток увеличивается в 4 раза по сравнению с исходным уровнем.

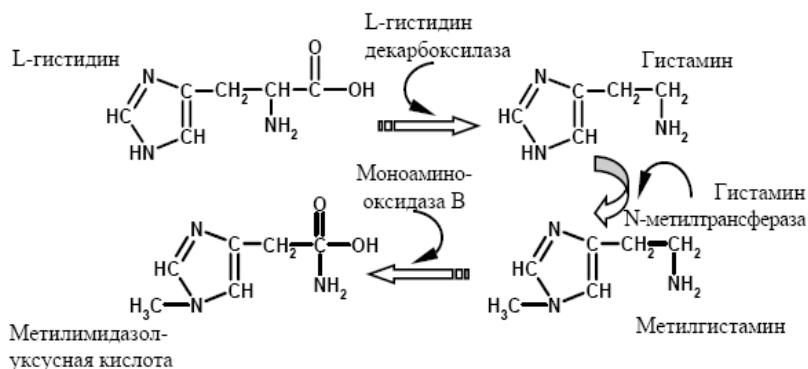


Рис. 20. Метаболизм гистамина (источник: Сидоров А.В., 2008)

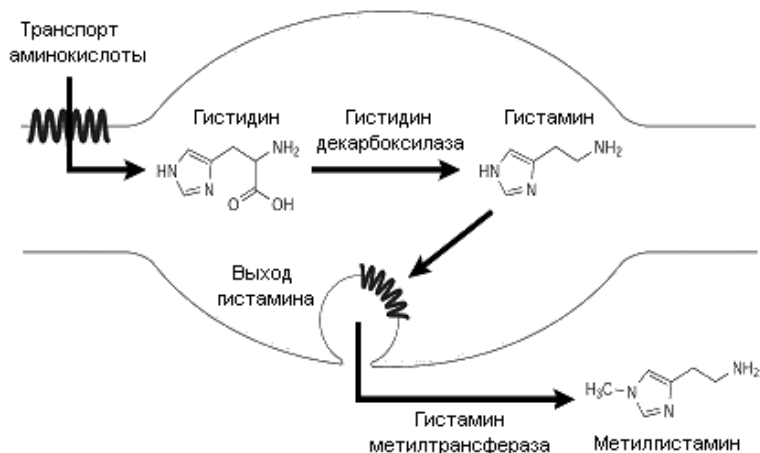


Рис. 21. Метаболизм гистамина.

Гистидин захватывается варикозным расширением нервного волокна и декарбоксилируется, гистамин транспортируется в везикулы, выводится и метилируется. Транспорт гистидина и гистамина через цитоплазматическую мембрану осуществляется при помощи белков-переносчиков (с изменениями из: Naas H.L. et al., 2008)

Известно, что гистамин способствует активации фагоцитоза, усиливает бласттрансформацию. Накапливаясь в больших количествах, гистамин угнетает иммунный ответ, чрезмерно активируя выделение фагоцитами лизосомальных ферментов, повреждающих клетки, в том числе иммунокомпетентные, а также вызывая накопление в организме в числе других лимфоцитов Т-регуляторных лимфоцитов, подавляющих иммунный ответ, снижает пролиферацию лимфоцитов в периферической крови.

Открыты H_1 , H_2 и H_4 рецепторы к гистамину, которые экспрессируются на тучных клетках, моноцитах, натуральных киллерах, макрофагах, эозинофилах, Т- и В-лимфоцитах, дендритных клетках. Последние при воздействии гистамина увеличивают экспрессию CD86 и МНС-II и продукцию ИЛ-6, ИЛ-8.

Основной плейотропный (множественный) регуляторный характер действия гистамина в межклеточных взаимодействиях связан с четырьмя подтипами клеточных рецепторов, неодина-

ково выраженных в различных типах клеток и обозначаемых как H_1 , H_2 , H_3 и H_4 .

За годы исследований, посвященных влиянию гистамина на иммунный ответ, было получено множество противоречивых данных. Эти несоответствия могли возникнуть не только в результате экспрессии различными клетками различных рецепторов к гистамину, но и в зависимости от условий экспериментов. Участие рецепторов гистамина в иммунном ответе заключается в том, что воздействие на рецепторы подтипа H_1 усиливает иммунный ответ, воздействие на рецепторы подтипа H_2 – ослабляет, в то время как оба подтипа этих рецепторов задействованы в поддержании баланса между Т-хелперами первого и второго типов.

По мнению исследователей, изучающих тимус, гистамин оказывает тормозящее влияние на антигеннезависимую дифференцировку Т-лимфоцитов. На зрелых лимфоцитах имеются рецепторы к гистамину, который активирует супрессорную активность лимфоцитов.

При отсутствии гистамина дендридные клетки синтезируют цитокины для активации Т-хелперов первого типа, а при его участии – цитокины для активации Т-хелперов второго типа.

Таким образом, гистамин является одним из медиаторов, участвующих в регуляции жизненных функций, оказывает неоднозначное влияние на клетки лимфоидного и нелимфоидного ряда в тимусе, высвобождается при распознавании антигена, влияет на иммунные реакции.

Люминесцентно-гистохимический метод выявления гистамина в тканях

Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста (Cross, Ewen, Rost, 1971) применяется для выявления гистамина в гранулах содержащих его клеток (рис. 22, 23). Между парами ортофталевого альдегида и гистамином в тканях происходит реакция, в ходе которой образуются флуоресцирующие производные имидазолилэтиламина. Под люминесцентным микроскопом образовавшийся комплексный продукт дает в срезах при малом содержании голубое свечение, при среднем – зеленое, при большом – лимонно-желтое.

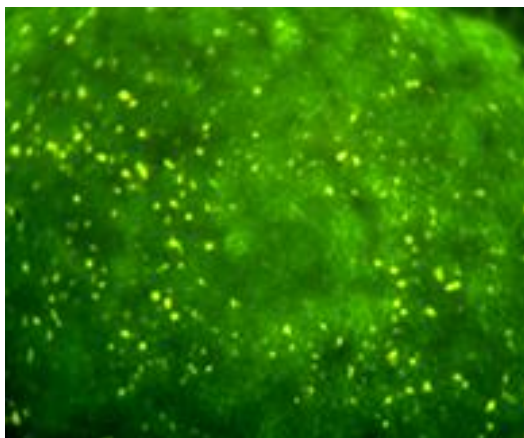


Рис. 22. Гистаминсодержащие люминесцирующие клетки в корковом веществе долек тимуса. Метод Cross-Ewen-Rost. Микроскоп ЛЮОММ-2. Об. 4, ок. 10

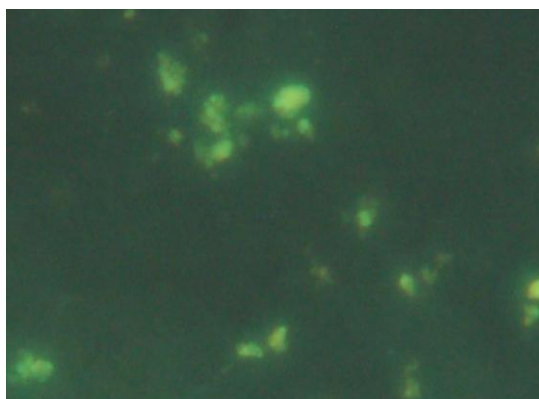


Рис. 23. Гистаминсодержащие люминесцирующие клетки в корковом веществе долек тимуса. Метод Cross-Ewen-Rost. Микроскоп ЛЮОММ-2. Об. 40, ок. 10

Криостатные срезы тимуса обрабатываются в предварительно разогретой камере парами ортофталевого альдегида в термостате при температуре 100 °С в течение 10 секунд. Затем срезы при той же температуре на две минуты помещаются в другую камеру, содержащую пары воды. Далее срезы высушиваются в течение 5 минут в термостате при 70 °С.

Микроскопия препаратов производится под люминесцентным микроскопом при длине возбуждающего света 360 нм. Для определения гистамина используется светофильтр №7 с длиной волны 515 нм.

Люминесцентно-гистохимический метод Кросса позволяет выявить гистаминсодержащие клетки как в корковом, так и в мозговом веществе долек тимуса, в том числе тучные клетки и макрофаги.

При исследовании тимуса лабораторных животных методом Кросса гистамин обнаружен в лимфоцитах, тимусных тельцах, тучных клетках, люминесцирующих гранулосодержащих клетках тимуса, эндотелии сосудов.

Вопросы для закрепления материала

1. Перечислите нейромедиаторные биогенные амины.
2. В каких процессах принимают участие нейромедиаторные биогенные амины: катехоловые амины, серотонин, гистамин.
3. Укажите ферменты, принимающие участие в метаболизме катехоловых аминов, серотонина, гистамина.
4. Укажите предшественники норадреналина, серотонина, гистамина.
5. Укажите биогенные амины, участвующие в регуляции проницаемости кровеносных сосудов.
6. Укажите органы, в которых синтезируются нейромедиаторные биогенные амины.
7. Какие клеточные элементы тимуса содержат нейромедиаторные биогенные амины?
8. Какие методы позволяют выявить катехоловые амины?
9. Какие методы позволяют выявить серотонин?
10. Что выявляет метод Кросса-Эвена-Роста?
11. Что такое плейотропный эффект нейромедиатора?
12. Как осуществляется постановка реакции по методу Фалька и по методу Кросса?
13. Существует ли связь между катехоловыми аминами, серотонином и гистамином?
14. Какие клетки имеют рецепторы к нескольким нейромедиаторным биоаминам?
15. Укажите роль катехоламинов, серотонина и гистамина в регуляции функций иммунной системы.

Глава 4. ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ

Морфология тучных клеток

Тучные клетки – гранулярные клетки (рис. 24), которые встречаются во многих органах. Наибольшее количество клеток располагается вблизи кровеносных и лимфатических сосудов и нервных окончаний вегетативной нервной системы. В гранулах тучных клеток содержатся биологически активные вещества: гистамин, серотонин, дофамин, гепарин, цитокины, хемокины, монокины, интерлейкины, ростовые факторы, протеогликианы, протеазы. Установлено, что гликозаминогликан гепарин замедляет дифференцировку миобластов, а в сочетании с фактором роста фибробластов усиливает их пролиферацию.

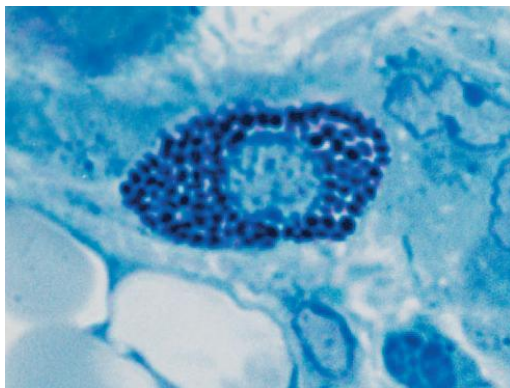


Рис. 24. Тучная клетка. Окраска по Гимза (Dvorak A.M., 2005)

Тучные клетки иногда называют тканевыми базофилами, подразумевая, что базофилы, выходя из кровеносного русла, в тканях превращаются в тучные клетки. Однако сравнение морфологического строения тучной клетки и базофила чаще всего оказывается не в пользу данной теории происхождения тучных клеток (рис. 25).

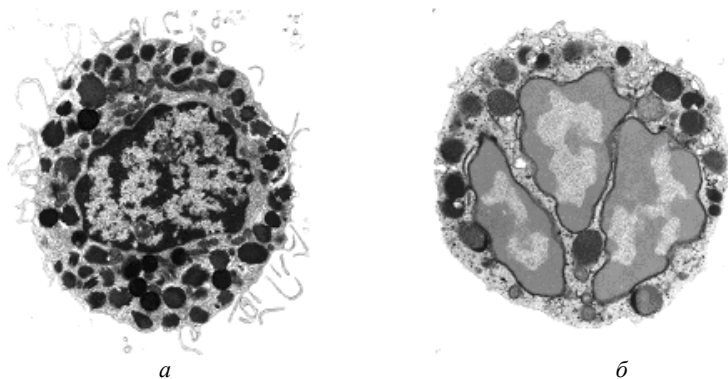


Рис. 25. Ультраструктура тучной клетки и базофила человека: *а* – тучная клетка имеет однодольчатое ядро и множество гранул различной величины, *б* – базофил имеет полидольчатое ядро и малочисленные крупные гранулы в цитоплазме. Тучная клетка крупнее базофила: *а* – увеличение $\times 10,000$; *б* – увеличение $\times 17,000$ (Dvorak A.M., 2005)

Тучные клетки являются ключевыми клетками аллергической реакции I типа и воспаления. При воздействии ряда факторов увеличивается количество тучных клеток и происходит их дегрануляция. Тучные клетки влияют и на ангиогенез с помощью факторов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8.

Проникновение тучных клеток в строму тимуса и их тесный контакт с тимическими эпителиальными клетками являются важными факторами для стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Тучные клетки тимуса расположены в периферической части долек вокруг кровеносных сосудов, в соединительнотканых корковых перегородках в периваскулярном пространстве тимусных долек. Выделяя медиаторы, регулирующие сосудистую проницаемость (гистамин, серотонин и др.), тучные клетки облегчают контакт и переход стволовых клеток и лимфоцитов при рециркуляции и миграции образовавшихся тимоцитов.

Кроме того, тучные клетки сами способны взаимодействовать с Т-лимфоцитами (рис. 26).

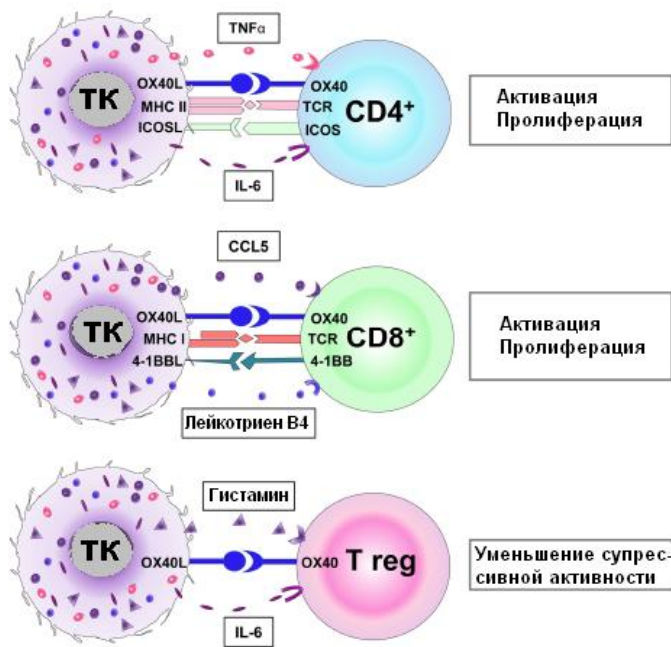


Рис. 26. Рецепторы и медиаторы взаимодействия между лимфоцитами и тучными клетками:

ТК – тучные клетки, Treg – регуляторные Т-лимфоциты, $CD4^+$ – Т-лимфоциты хелперы, $CD8^+$ – Т-лимфоциты киллеры. На поверхности тучных клеток и лимфоцитов находятся специфические молекулы, рецепторы и их лиганды, с помощью которых осуществляется клеточное взаимодействие (с изменениями из: Bulfone-Paus S., Bahri R., (2015))

Полагают, что проницаемость гематотимического барьера для антигенов зависит от активности макрофагов, однако основную роль в регуляции его отводят тучным клеткам. Благодаря биологически активным веществам (гепарин, серотонин, норадреналин, гистамин, простагландины и др.) они регулируют межклеточные взаимодействия, проницаемость гематотимического барьера, миграцию Т-лимфоцитов.

Методы изучения тучных клеток

Для исследования тучных клеток применяется множество методов. Отличия этих методов друг от друга заключаются преимущественно в том, что при их использовании выявляются различные компоненты гранул тучных клеток.

Так, существуют иммуногистохимические маркеры тучных клеток, которые выявляют количество тучных клеток вне зависимости от содержания их гранул – это мембранные рецепторы к иммуноглобулину E, различные виды рецепторов к гистамину и другим нейромедиаторным биогенным аминам. Кроме того, хорошо выявляет тучные клетки и электронная микроскопия, которая позволяет отличить молодую тучную клетку от зрелой по наличию развитого аппарата Гольджи.

Существуют множественные гистохимические методы, основанные на дифференцировке содержания гранул. Это окраски, в которых применяются метахроматичные красители – методы с использованием азура 2 и толуидинового синего. В различных модификациях окраски по Романовскому – Гимза используется азур 2, который применяется для окраски тучных клеток в европейских научных лабораториях.

Кроме того, тучные клетки чувствительны к окраске альциановым синим и сафранином, это позволяет дифференцировать в них белковые и углеводные компоненты, воспринимают окраску суданом черным В – при наличии в гранулах липидов.

Следует сказать также о методах, позволяющих выявлять биогенные амины и ферменты. Метод Фалька обнаруживает в тучных клетках катехоламины и серотонин, а метод Кросса – гистамин.

Методы с использованием флуоресцентных меток позволяют определить в тучных клетках гепарин, гистамин, различные белковые компоненты. Кроме того, широко используются реакции на такие ферменты тучных клеток, как триптаза, химаза, моноамин- и диаминооксидаза.

I. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа. Этот метод применяется для выявления в структурах тимуса биогенных аминов: катехоламинов и серотонина (см. раздел 2.1.1).

II. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста (Cross, Ewen, Rost, 1971) применяется для выявления гистамина в гранулах содержащих его клеток (см. раздел 2.1.2).

III. Люминесцентный метод с использованием флуоресцирующей метки к авидину:

1. Криостатные (или депарафинированные) срезы тимуса инкубируются 30 минут при комнатной температуре в темноте в рабочем растворе авидина, маркированного флуоресцентной меткой, например Alexa-488. Рабочий раствор готовится из готового меченого авидина (Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, Germany) и фосфатного буфера в соотношении 1:200.

2. Раствор авидина сливается, срезы тщательно промываются фосфатным буфером.

3. После промывки в фосфатном буфере срезы заключаются под покровное стекло в раствор, содержащий фосфатный буфер и глицерин (1:1).

4. Препараты анализируются под люминесцентным микроскопом при длине волны возбуждающего света 495 нм.

Этот метод применяется для выявления гепарина в гранулах содержащих его клеток. Между авидином и гепарином происходит реакция, в ходе которой образуется комплексный продукт. Под люминесцентным микроскопом этот продукт дает зеленое (цвет флуоресцирующей метки) свечение.

IV. Окраска полихромным толуидиновым синим по методу Унна:

1. На депарафинированные срезы на 5-10 минут наносят раствор полихромного толуидинового синего.

Для удаления парафина применяют растворяющий его ксилол или толуол (несколько порций). Срез выдерживают в трех порциях ксилола по 3-5 минут. Однако ксилол в воде не растворяется, и поэтому сразу перенести срез из ксилола в воду нельзя: необходимо предварительно освободиться от ксилола. Это производят в спирте, обрабатывая срез сначала абсолютным (2-3 минуты), а затем 96% (2-3 минуты) и 70% (2-3 минуты), лишь после этого стекло со срезом можно перенести в емкость с дистиллированной водой на 1-2 минуты. Срез готов к окраске.

Для приготовления раствора берут навески по 0,5 г метиленового синего и толуидинового синего, и каждую растворяют в минимальном количестве 75% спирта. Затем вливают оба раствора в 100 мл 1% раствора карбоната калия (K_2CO_3) и смесь кипятят при постоянном перемешивании в течение 2 минут. Охлажденный раствор профильтровывают.

2. Сливают раствор полихромного толуидинового синего со срезов, промывают дистиллированной водой, дифференцируют в уксуснокислом спирте от 1 до 2 минут.

Для того чтобы получить уксуснокислый спирт, смешивают в колбе 26 мл дистиллированной воды и 70 мл 96% этилового спирта. После этого аккуратно вливают 1 мл ледяной уксусной кислоты и перемешивают стеклянной палочкой.

После дифференцировки срез промывают дистиллированной водой.

3. Проводят срез в спиртах восходящей крепости. Для этого его погружают последовательно в растворы этилового спирта (70%, 80, 96, 100%). Для приготовления 100% этилового спирта требуется прокаленный в термостате при 100 °С до серого оттенка медный купорос. Прокаленный медный купорос помещают в колбу, заливают 96% этиловым спиртом, плотно притирают крышку колбы и держат до тех пор, пока купорос не примет свой первоначальный цвет (сине-голубой). Приготовление 100% этилового спирта может занять несколько дней, поэтому прежде чем производить окрашивание срезов, следует все подготовить заранее.

4. Помещают срез на 1 минуту в ксилол, затем фильтровальной бумагой убирают излишки ксилола и заключают окрашенный срез в прозрачную среду (канадский бальзам или полистирол) под покровное стекло.

Для того чтобы получить качественный препарат, заключенные срезы выдерживают в горизонтальном положении в темном месте при комнатной температуре. Микроскопию препаратов проводят через трое-четверо суток. Тучные клетки в световом микроскопе хорошо визуализируются при увеличении $\times 400$, отдельные гранулы можно рассмотреть только при увеличении $\times 900$.

Эта окраска применяется для контроля состояния тканевых мукополисахаридов, в том числе и гепарина в тучных клетках лимфоидных органов.

Голубую α -ортохромную окраску дает несulfатированный незрелый гепарин; β -метахроматичную (чернильно-фиолетовую) – более sulfатированный созревающий гепарин; γ -метахроматичную (пурпурную) – зрелый гепарин (Д.С. Гордон, 1982).

При окраске полихромным толуидиновым синим тучные клетки подразделяются на следующие виды:

1. По состоянию мукополисахаридов:

а) α -ортохромные виды тучных клеток с голубой окраской цитоплазмы и несulfатированным, незрелым гепарином в ней;

б) β_1 -метахроматичные тучные клетки с фиолетовым окрашиванием гранул в цитоплазме и с более sulfатированным, незрелым гепарином в ней;

в) β_2 -метахроматичные тучные клетки, имеющие фиолетовую цитоплазму с красноватым оттенком за счет созревания sulfатированного гепарина;

г) β_3 -метахроматичные тучные клетки с красно-фиолетовой цитоплазмой и почти зрелым гепарином;

д) γ -метахроматичные тучные клетки с пурпурной окраской цитоплазмы и с полностью sulfатированным, зрелым гепарином в гранулах.

2. По степени дегрануляции (классификация Д.П. Линднер и соавт. (1980) и Г.Ю. Стручко (1999) выделяют следующие формы тучных клеток:

а) T_0 -формы – гранулы плотно расположены в цитоплазме, ядро визуально не определяется;

б) T_1 -формы – ядро хорошо просматривается, гранулы располагаются внутри клетки, за пределы цитоплазматической мембраны не выходят;

в) T_2 -формы – гранулы частично выходят за пределы неповрежденной цитоплазматической мембраны;

г) T_3 -формы – полностью дегранулированные виды тучных клеток с разорванной цитоплазматической мембраной.

V. Окраска азуром по Романовскому – Гимза

1. На депарафинированные срезы на 20-30 минут наносят рабочий раствор Романовского – Гимза.

Чтобы депарафинировать срез, его на 10 минут погружают в толуол, затем на 5 минут в ксилол, после на 5 минут в 96% этиловый спирт и на 5 минут в дистиллированную воду. Срез готов к окраске.

Для приготовления красителя используют специальный раствор (продается готовым с указанием срока годности), разводят его в пропорции, указанной на этикетке, фосфатным буфером.

2. Сливают рабочий раствор со срезов, промывают фосфатным буфером.

3. Проводят срез в спиртах восходящей крепости. Для этого его погружают последовательно в растворы этилового спирта (70%, 80, 96, 100%).

4. Помещают срез на 1 минуту в ксилол, затем фильтровальной бумагой убирают излишки ксилола и заключают окрашенный срез в прозрачную среду (канадский бальзам или полистирол) под покровное стекло.

Для того чтобы получить качественный препарат, заключенные срезы выдерживают в горизонтальном положении в темном месте при комнатной температуре. Микроскопию препаратов проводят через трое-четыре суток. Тучные клетки в световом микроскопе хорошо визуализируются при увеличении $\times 400$, отдельные гранулы можно рассмотреть только при увеличении $\times 900$.

Полезно обратить внимание на то, что метахромазия тучных клеток в окрасках по Унна и по Романовскому-Гимза не является идентичной. Для исключения путаницы рекомендуем метахроматичные (вишневого оттенка) клетки в окраске по Романовскому-Гимза относить к азурофильным, а ортохромные (цвета красителя) – к неазурофильным. В данном случае классификация по степени метахромазии, как это имело место в случае окраски тучных клеток по методу Унна, неуместна.

VI. Окраска альциановым синим и сафранином

Существует множество методик, в которых используются красители сафранин и альциановый синий, которые отличаются кислотностью среды.

Окраска при $pH=2,5$ выявляет слабокислые гликозаминогликаны и сиалопротеины (окрашиваются в темно-синий цвет), а также белковые компоненты (окрашиваются сафранином в оттенки розового).

1. На депарафинированные срезы на 20-30 минут наносят 1% раствор альцианового синего в 3% уксусной кислоте ($pH=2,5$).

2. Сливают раствор альцианового синего, наносят на 1 минуту 3% уксусной кислоты.

3. Окрашивают 0,1% раствором сафранина в 1% уксусной кислоте в течение 5 минут.

4. Проводят срез в спиртах восходящей крепости. Для этого его погружают последовательно в растворы этилового спирта (70%, 80, 96, 100%). Общее время проводки по спиртовым растворам составляет 5 минут.

4. Помещают срез на 1 минуту в ксилол, затем фильтровальной бумагой убирают излишки ксилола и заключают окрашенный срез в прозрачную среду (канадский бальзам или полистирол) под покровное стекло.

Для того чтобы получить качественный препарат, заключенные срезы выдерживают в горизонтальном положении в темном месте при комнатной температуре. Микроскопию препаратов проводят через трое-четверо суток. Тучные клетки в световом микроскопе хорошо визуализируются при увеличении $\times 400$, отдельные гранулы можно рассмотреть только при увеличении $\times 900$.

Окраска при $pH=1,0$ выявляет только сульфатированные гликозаминогликаны, а также белковые компоненты (окрашиваются сафранином в оттенки розового). Для этой разновидности окраски вместо уксусной кислоты применяется 0,1 н соляная кислота.

Существует универсальный способ описания морфологического и функционального состояния тучноклеточной популяции в гистологических препаратах. Он заключается в том, что словесное описание тучной клетки заменяется заполнением матрицы – статистической таблицы, где подлежащим по умолчанию является тучная клетка, а сказуемыми – ее признаки. Каждая клетка описывается отдельно под увеличением, требующим использования иммерсионного масла. Возможные варианты в пределах каждого признака предварительно обозначаются цифрами. Минимальное количество строк ограничено количеством тучных клеток в препарате, максимальное количество строк не ограничено.

Заполнение матрицы приводит к значительному упрощению схемы научного исследования, которая при этом будет иметь

вид: фиксирование описания в шаблон таблицы – работа с одной таблицей – подведение итогов. За счет упрощения схемы исследования существенно экономится время. Для обработки данных не нужно составлять никаких дополнительных таблиц.

Тщательная фиксация максимального количества информации (десять признаков, в зависимости от поставленных задач может быть и больше – например, отдельной графой указать вид воздействия или сроки воздействия) с последующей сортировкой данных в программе Excel с выделением отдельных групп по одному или нескольким признакам делает возможным сопоставление между собой любых признаков, а также подведение собранного материала под любую классификацию.

Использование этого метода дает возможность проведения как многофакторного, так и корреляционного анализа между любыми признаками без построения дополнительных таблиц, что позволяет расширить область интерпретации результатов в связи с большим количеством признаков и получить наиболее полное представление о функциональных процессах в тучноклеточной популяции.

Ниже приведена матрица для описания морфологического и функционального состояния тучноклеточной популяции в гистологических препаратах, (на примере тимуса, окраска по методу Унна полихромным толуидиновым синим), используемая на кафедре медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (рационализаторское предложение № 1171 «Способ описания морфологического и функционального состояния тучноклеточной популяции в гистологических препаратах» от 3 сентября 2013 года, выданное В.С. Гордовой и соавт.).

№ ТК – порядковый номер описываемой тучной клетки, всего в таблице на препарат 50 строчек.

1. Количество тучных клеток под иммерсионным увеличением

- 1 – одиночная тучная клетка
- 2 – малая группа (рядом 2-4 тучные клетки)
- 3 – средняя группа тучных клеток (5-7 клеток)
- 4 – большая группа тучных клеток (более 7)

2. Цвет тучной клетки

- 1 – ортохромные (голубая цитоплазма)
- 2 – β_1 – фиолетовая цитоплазма
- 3 – β_2 – фиолетовая цитоплазма с красноватым оттенком
- 4 – β_3 – красно-фиолетовая цитоплазма

3. Форма тучной клетки

- 1 – овальные
- 2 – округлые
- 3 – вытянутые
- 4 – полигональные
- 5 – бесформенные (россыпь гранул)

4. Ядро тучной клетки

- 1 – не визуализируется
- 2 – визуализируется, покрыто гранулами
- 3 – визуализируется среди плотных гранул
- 4 – между ядром и гранулами имеет место выраженное пространство
- 5 – отсутствие клеточной структуры (россыпь гранул)

5. Характеристика ядра тучной клетки

- 1 – не окрашено
- 2 – окрашено (если цвет ядра различим, то для его окраски:
21 – ортохромное, 22 – β_1 , 23 – β_2 , 24 – β_3 , 25 – γ)

6. Гранулы внутри тучной клетки

- 1 – не визуализируются («пластилиновое пятно»)
- 2 – плотно расположенные гранулы («гранат»)
- 3 – рыхло расположенные гранулы
- 4 – отсутствие клеточной структуры (россыпь гранул)

7. Наличие промежутков между гранулами около цитоплазматической мембраны («махровые края»)

- 1 – есть промежутки
- 2 – нет промежутков

8. Гранулы снаружи тучной клетки

- 1 – гранулы не выходят за пределы клетки
- 2 – рядом с клеткой единичные гранулы (1-5)

- 3 – рядом с клеткой группа гранул (6-10)
- 4 – рядом с клеткой более 10 гранул
- 5 – тотальная дегрануляция (россыпь гранул)

9. Цитоплазматическая мембрана тучной клетки

- 1 – целая
- 2 – целостность мембраны нарушена

Пример описания тучной клетки

Словесное описание препарата:

В соединительнотканной корковой перегородке тимуса видна группа из трех тучных клеток. Клетка 1 овальной формы, ортохромная, в ней не визуализируются гранулы и ядро, цитоплазматическая мембрана не нарушена, гранул вне клетки не наблюдается. Клетка 2 имеет полигональную форму, β_2 – метакроматичная, имеет фиолетовую цитоплазму с красноватым оттенком, в ней, среди плотных гранул, визуализируется неокрашенное ядро, между гранулами тучной клетки, прилежащими к цитоплазматической мембране, различимы промежутки, вне клетки видны единичные гранулы, цитоплазматическая мембрана не нарушена. Клетка 3 имеет округлую форму, β_3 – метакроматичная, имеет красно-фиолетовую цитоплазму, в ней различимы рыхло расположенные гранулы, среди них – голубое ядро, вне клетки гранулы не визуализируются, цитоплазматическая мембрана не нарушена.

Вид заполненной статистической таблицы

№ ТК	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	1	1	1	1	1	2	1	2
2	2	3	4	3	2	2	1	2	2
3	2	4	3	4	1	4	2	1	2

Вопросы для закрепления материала

1. Укажите особенность морфологии тучной клетки.
2. Чем тучная клетка отличается от базофила?

3. Какие общие черты наблюдаются у базофила и тучной клетки?
4. В каких процессах принимают участие тучные клетки?
5. В каких тканях и органах выявляются тучные клетки?
6. В чем заключается связь тучных клеток с нервными волокнами?
7. В чем заключается связь тучных клеток с кровеносными сосудами?
8. Укажите биогенные амины, которые находятся в гранулах тучных клеток.
9. Укажите ферменты, которые находятся в гранулах тучных клеток.
10. Каково принципиальное отличие методов, выявляющих тучные клетки?
11. Перечислите иммуно-гистохимические методы, выявляющие тучные клетки.
12. Перечислите гистохимические методы, выявляющие тучные клетки.
13. Как осуществляется выявление тучных клеток по методу Фалька?
14. Как осуществляется выявление тучных клеток по методу Кросса?
15. Какие биогенные амины можно выявить в тучных клетках с помощью метода Фалька и метода Кросса?
16. Какой компонент тучных клеток выявляет метод с использованием авидина? Опишите этот метод.
17. Как окрашивать тучные клетки по методу Унна?
18. Объясните проведение гистологического среза по спиртам восходящей крепости при различных методах окраски.
19. Дайте классификацию тучных клеток по метахромазии при окраске по методу Унна.
20. Укажите порядок окраски тучных клеток по методу Романовского-Гимза.
21. Как окрашивать тучные клетки альциановым синим и сафранином.
22. В чем смысл матрицы для описания морфологического и функционального состояния тучноклеточной популяции в гистологических препаратах?

Глава 5. ЭНДОКРИННЫЕ КОМПОНЕНТЫ ТИМУСА

Понятие о дисперсной эндокринной системе

В эндокринной системе позвоночных животных и человека эволюционно древним и крупнейшим звеном является ДЭС, которая представлена комплексом одиночно расположенных рецепторно-эндокринных клеток закрытого и открытого типа. Основная масса этих клеток находится в эпителиальных тканях слизистых оболочек органов пищеварительной, дыхательной, мочеполовой системы и кожи, однако они широко представлены и в лимфоидных органах.

В функциональном отношении ДЭС очень тесно связана с пептидергическими нейронами и клетками иммунной защиты, вне зависимости от их расположения, которые вместе выступают как единая система первичного реагирования, оповещения и защиты организма. Клетки ДЭС, воспринимая информацию из внешней и внутренней среды организма, реагируют на нее выделением биогенных аминов (серотонина, катехоламинов, гистамина) и пептидных гормонов, которые оказывают локальные (ауто-, юкста-, паракринные) эффекты, и дистантные (эндокринные) влияния. Эти клетки содержат в себе также нейронспецифическую энолазу и хромагранин А.

Клетки ДЭС, обладающие перечисленными свойствами, были названы Пирсом клетками APUD-серии. APUD – аббревиатура, от англ. «Amine Precursor Uptake and Decarboxylation» – поглощение предшественника амина и его декарбоксилирование, что отражает последовательность метаболической цепи производства биогенного амина и пептидного гормона. Клетки ДЭС, имеющие эти свойства, называют апудоцитами.

Таким образом, определения «ДЭС» и «APUD-серия клеток» в некоторой степени являются синонимами и в равной степени могут быть использованы при описании специфических клеток. Свойствами клеток APUD-серии обладают тучные клетки соединительной ткани, пептидергические нейроны, секреторные кардиомиоциты и др.

Многие пептидергические нейроны выделяют те же самые пептидные гормоны, что и клетки ДЭС, такие как сома-

тостатин, VIP, эндорфины, бомбезин, субстанция Р, нейро-тензин, холецистокинин, ранее считавшиеся нейропептидами. Такие свойства клеток ДЭС, как хромофильность, аргирофильность, аргентаффинность, наличие в них нейронспецифической энолазы, продукция биогенных аминов и нейропептидов наводили исследователей на мысль, что они являются особой линией дифференцировки клеток нервной системы. По мнению Пирса, создателя концепции о клетках APUD-серии, все ее клетки являются производными нейроэктодермы и представляют собой единую гистогенетическую систему эндокринных клеток. Некоторые гормоны этих клеток содержатся и в экзокринных клетках желудочно-кишечного тракта, которые не относятся к производным нейроэктодермы. При этом установлено, что рецепторы к указанным гормонам имеются у клеток не только органов пищеварительной, но и других систем организма.

То, что регуляция трофики и пролиферации клеток осуществляется одними и теми же пептидными гормонами, выделяемыми нервными клетками и клетками ДЭС, подтверждает концепцию универсальных функциональных блоков. Согласно этой концепции одни и те же регуляторные вещества используются различными тканевыми производными для осуществления фундаментальных функций поддержания гомеостаза многоклеточных организмов независимо от уровня их структурно-функциональной организации.

Клетки ДЭС представляют в тимусе особую популяцию. Они расположены во всех морфофункциональных зонах, но особенно их много на границе между корковым и мозговым веществом долек тимуса. Они обладают всеми свойствами клеток ДЭС, продуцируют соматотропный гормон, соматостатин, нейротензин, паратгормон, кальцитонин, адренкортикотропный и другие гормоны, а также нейромедиаторные биогенные амины и ферменты. Предполагают, что они участвуют в регуляции деятельности различных структур тимуса и его взаимодействии с другими органами и системами.

Сигнальные молекулы тимического происхождения

Наличие в тимусе клеток, вырабатывающих или экспрессирующих нейромедиаторы и нейропептиды, обуславливает клеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия. Например, ТЭК секретируют фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны, имеющие молекулярное сходство с хорионическим гонадотропином, – гонадотропин-рилизинг-фактор, кортикотропин-рилизинг-фактор; тимоциты вырабатывают рилизинг-факторы лютеинизирующего гормона, гонадотропина, кортикотропина, тиреоидного гормона; макрофаги – кортикотропин-рилизинг-фактор, оказывающий аутокринное и паракринное действие.

Эпителиальные клетки и лимфоциты способны к выработке и рецепции нейропептидов (табл. 6).

Таблица 6

Выработка и рецепция нейропептидов
эпителиальными и лимфоидными клетками тимуса

Нейропептид	ТЭК		Лимфоциты	
	выработка	рецепция	выработка	рецепция
Окситоцин	да			да
Вазопрессин	да			да
Соматостатин	да	да		да
VIP	да		да	да
Мет/энкефалин	да		да	
β-эндорфин	да	да	да	да

Что касается нейромедиаторных биогенных аминов: катехоламинов, серотонина и гистамина, то они обнаруживаются в тучных клетках, макрофагах, дендритных клетках, клетках эпителиального происхождения.

Помимо нейропептидов, в тимусе синтезируются собственные пептиды, оказывающие регулирующее действие на протеолитические процессы, происходящие в клетках организма.

В 60-70-х гг. прошлого столетия в различных лабораториях мира из тимуса было получено около десятка различных

пептидов: тимозины, тимический гуморальный фактор, тимопэтин, тимостерин, тимический полипептидный препарат, растворимый фактор тимуса, тимостимулин, вилозен, тактивин, тималин.

Одним из первых полипептидных экстрактов тимуса был тимозин, выделенный в 1966 г. Гомогенная фракция 8 тимозина, представлявшая собой агрегат полипептидных цепей, включавших 108 аминокислотных остатков, стимулировала образование антител и способствовала дифференцировке клеток костного мозга в антителообразующие клетки.

В 1981 г. из аутолизата тимуса был получен тактивин – комплексный препарат, содержащий пептиды с молекулярной массой от 1,5 до 6 кДа. Под влиянием тактивина повышалось содержание тимического сывороточного фактора, возрастала активность экспрессии дифференцировочных рецепторов лимфоцитов.

Близкий по иммунологическим свойствам пептидный препарат тималин получен путем кислотного гидролиза тимуса крупного рогатого скота. При экспериментальном изучении тималина показана его способность модулировать процессы реопуляции дифференцировочных рецепторов лимфоцитов (Смирнов и др., 1992).

Сравнительное исследование влияния экстрактов тимуса показало, что независимо от методики их получения все они обладают близкими иммунобиологическими свойствами.

В 1988 г. был выделен индивидуальный иммуноактивный компонент препаратов тимуса, названный тимогеном. Выделенное вещество оказалось дипептидом, состоящим из глутаминовой кислоты и триптофана – L-глутамил-L-триптофан (рис. 27).

В организме дипептид быстро распадается на глутаминовую кислоту и триптофан, используемые клетками в процессах белкового синтеза.

В настоящее время на основе этого дипептида выпускается препарат с торговым названием «Тимоген». Пептид входит также в состав препарата «Цитовир-3». Тимоген увеличивает число иммунных розеткообразующих клеток к ГАМК, дофамину и

норадреналину, в меньшей степени – к ацетилхолину, серотонину, глицину и опиатам.

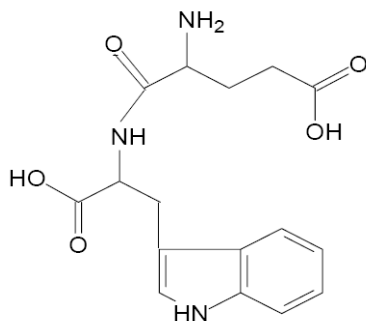


Рис. 27. L-глутамил-L-триптофан

Тимусные пептиды и сопряженные с их функцией ферменты следует рассматривать как сложную адаптивную систему организма, организующую реализацию приспособительных реакций на всех уровнях его интеграции. Возможно, разнообразные эффекты одного пептида объясняются не его непосредственным действием, а модуляцией эффектов нервной и гуморальной регуляции (Смирнов В.В., 2003).

Таким образом, в тимусе наличествуют субстраты для взаимодействия нервной и эндокринной систем, которые модулируют функции иммунной системы с помощью нейротрансмиттеров, нейропептидов и гормонов, а иммунная система взаимодействует с нейроэндокринной системой с помощью иммунопептидов и других иммуотрансмиттеров.

Вопросы для закрепления материала

1. Что такое ДЭС?
2. В каких органах локализованы клетки ДЭС?
3. Какие клетки можно отнести к ДЭС?
4. Чем представлены клетки ДЭС в тимусе?
5. Какие вещества секретируют клетки ДЭС?
6. Как расшифровывается аббревиатура APUD?

7. Какая связь существует между клетками ДЭС и клетками APUD-серии?

8. Назовите клетки, которые относятся и к ДЭС, и к APUD-серии.

9. Перечислите пептидные гормоны, выделяемые пептидэргическими нейронами и клетками ДЭС?

10. Предшественники каких биогенных аминов подвергаются декарбоксилированию?

11. Расскажите о выработке и рецепции нейропептидов эпителиальными клетками тимуса.

12. Расскажите о выработке и рецепции нейропептидов лимфоидными клетками тимуса.

13. Сравните выработку нейропептидов эпителиальными и лимфоидными клетками тимуса.

14. Сравните рецепцию нейропептидов эпителиальными и лимфоидными клетками тимуса.

15. Перечислите пептиды, выделяемые из тимуса.

16. Охарактеризуйте тимусный пептид тимозин.

17. Дайте характеристику тимусному пептиду тактивину.

18. Охарактеризуйте тимусный пептид тималин.

19. Расскажите о тимусном пептиде тимогене.

Глава 6. ХОРИОНИЧЕСКИЙ ГОНАДОТРОПИН

Строение и функции хорионического гонадотропина

Хорионический гонадотропин представляет собой гликопротеин, синтезируемый клетками синцитиотрофобласта плаценты в межворсинчатое пространство, миометрий, кровь. По своей химической структуре он является гликопротеином с молекулярным весом около 46 кДа, состоящим из двух различных субъединиц альфа и бета, связанных нековалентно друг с другом (рис. 28).

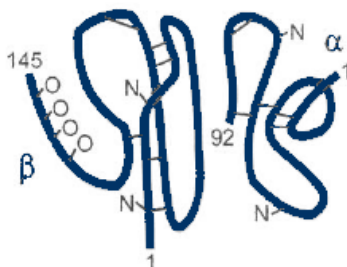


Рис. 28. Хорионический гонадотропин. Схематическое изображение: α – альфа-субъединица; β – бета-субъединица. Чёрточками обозначены дисульфидные мостики, буквами N и O обозначены N- и O-связанные олигосахариды (источник: Цырлина Е.В., Порошина Т.Е., 2008)

Альфа-субъединица хорионического гонадотропина человека идентична с альфа-субъединицами гормонов гипофиза (ТТГ, ФСГ и ЛГ) и состоит из 92 аминокислот, связанных дисульфидными мостиками. Бета-субъединица специфична и отличает его от других белковых гормонов. Она состоит из 145 аминокислот, в том числе 12 цистеинов, образующих 6 дисульфидных связей. Аминокислотная последовательность первых 114 аминокислот бета-субъединицы хорионического гонадотропина на 85% гомологична лютеинизирующему, на 36% – фолликулостимулирующему и на 46% – тиреотропному гормонам.

Высокая гомология между хорионическим гонадотропином и лютеинизирующим гормоном приводит к тому, что они взаимодействуют с общим рецептором, и это определяет сходство

их биологических и иммунологических свойств. Важную часть молекулы гормона составляют углеводы, на которые приходится около 30% его молекулярной массы. Содержание хорионического гонадотропина в крови и моче беременной женщины возрастает после имплантации зародыша в матку, составляя более 10 мМЕ/мл, гормон поддерживает синтез прогестерона желтым телом, уровень его в крови достигает максимума в середине первого триместра беременности и постепенно снижается в динамике беременности.

Роль хорионического гонадотропина заключается в инициации и стимуляции размножения клеток, их роста и дифференцировки клеток эмбриона. Гормон обеспечивает эмбриональное развитие, физиологическую, репаративную регенерации, нормализует деятельность систем организма, обеспечивает компенсацию при патологии печени; влияет на течение опухолевых процессов в репродуктивной системе.

В исследованиях с использованием методов количественной морфологии установлены мембраностабилизирующая, апоптотическая, липолитическая, ферменторегулирующая, гипобилирубинемическая, иммунорегулирующая, антиоксидантная функции хорионического гонадотропина.

Вопросы для закрепления материала

1. Что такое хорионический гонадотропин?
2. Укажите химический состав хорионического гонадотропина.
3. Из каких субъединиц состоит хорионический гонадотропин? Охарактеризуйте каждую из них.
4. С какими гормонами прослеживается средство хорионического гонадотропина?
5. Какими клетками и в каких органах синтезируется хорионический гонадотропин?
6. В чем заключается роль хорионического гонадотропина?
7. Какая связь существует между хорионическим гонадотропином и гормоном желтого тела?

Хорионический гонадотропин в медицинской практике

Определение хорионического гонадотропина в крови и моче является одним из методов диагностики беременности на ранних сроках, поскольку его содержание отражает физиологическое течение гестации.

Определение уровня хорионического гонадотропина в крови используется в диагностике хромосомных патологий у плода. Сочетанное определение хорионического гонадотропина, прогестерона, кортизола, тестостерона и свободного эстриола прогнозирует рождение маловесных плодов.

В клинической практике большие концентрации хорионического гонадотропина в крови обнаруживаются при трофобластической болезни. Если при физиологической беременности отношение иммунологически реактивного к биологически реактивному хорионическому гонадотропину составляет 1,1, то при пузырном заносе – 7,7, при хориокарциноме – до 16. Высокие концентрации хорионического гонадотропина указывают на рецидив трофобластической болезни, наличие метастазов. Клетки рака шейки, тела матки и яичников, а также яичек вырабатывают эктопический хорионический гонадотропин, структурно-аналогичный с хорионическим гонадотропином, секретлируемый трофобластом. Эктопическая секреция хорионического гонадотропина связана с эпигеномными изменениями в раковых клетках. С учетом иммуностропного эффекта хорионический гонадотропин используется в лечении опухолей.

Хорионический гонадотропин является триггером развития синдрома гиперстимуляции яичников. Экзогенный и эндогенный хорионический гонадотропин также является активатором синтеза сосудистого эндотелиального фактора, обуславливающего катастрофическую сосудистую проницаемость и выход жидкости за пределы сосудистого русла. Доказана роль хорионического гонадотропина и гистамина в регуляции проницаемости сосудов при патологии яичников.

Хорионический гонадотропин для использования в медицинской практике выпускается в виде лиофилизата. Разовая лечебная доза вводимого хорионического гонадотропина в медицинской практике – 500 ЕД.

Хорионический гонадотропин применяют при снижении функции половых желез у мужчин и женщин, обусловленном нарушением деятельности гипоталамуса и гипофиза; он показан больным с гипофизарной недостаточностью (болезнь Симмондса, синдром Шихана, пангипопитуитаризм любой этиологии, адипозогенитальная дистрофия, гипофизарная карликовость с явлениями полового инфантилизма, гипогонадотропный гипогонадизм с признаками евнухоидизма); ановуляторной дисфункцией яичников и связанным с ней бесплодием.

Хорионический гонадотропин используется для коррекции позднего полового развития; при привычном и угрожающем аборте в первом триместре беременности; в программе экстракорпорального оплодотворения, при дисфункциональных маточных кровотечениях у женщин в детородном возрасте; при двустороннем крипторхизме у детей, а также при одностороннем крипторхизме после оперативного лечения при наличии признаков евнухоидизма; хорионический гонадотропин применяют также с целью дифференциальной диагностики первичного и вторичного гипогонадизма у мужчин.

Вопросы для закрепления материала

1. Какая связь между хорионическим гонадотропином и ранними сроками беременности?
2. С какой целью используется определение уровня хорионического гонадотропина в крови?
3. При каких патологических состояниях наблюдается увеличение количества хорионического гонадотропина в организме?
4. Что такое эктопический хорионический гонадотропин?
5. Назовите лекарственную форму хорионического гонадотропина.
6. Укажите разовую лечебную дозу вводимого хорионического гонадотропина в медицинской практике.
7. При каких патологических состояниях и заболеваниях применяют хорионический гонадотропин?

Иммуномодулирующая роль хорионического гонадотропина

Хорионический гонадотропин является ключевым гормоном, обеспечивающим развитие беременности в связи с выраженным иммуномодулирующим эффектом. Он способствует фенотипическому созреванию клеток, обладающих цитотоксической активностью. Выработка хорионического гонадотропина начинается в течение часа после оплодотворения, что подавляет клеточный иммунитет матери. Это обеспечивает полноценность первой волны инвазии трофобласта. При нарушении данного процесса развивается плацентарная недостаточность. Активность Т-клеток и продукция цитокинов снижаются, что обеспечивает материнскую толерантность.

Хорионический гонадотропин в крови снижает активность Т-киллеров, усиливает приток Т-киллеров в матку. Хорионический гонадотропин разнонаправленно влияет на этапы иммуногенеза, он вызывает дозозависимую стимуляцию гуморального иммунного ответа и стимулирует образование NK- и NKT-клеток. Низкие дозы хорионического гонадотропина угнетают, высокие дозы увеличивают количество антителообразующих клеток в селезенке мышей, отмечено снижение интенсивности иммунных процессов при введении высоких доз хорионического гонадотропина.

Гормон усиливает миграцию стволовых клеток из костного мозга в кровоток, миграцию Т-лимфоцитов из тимуса в кровоток. Введение в организм мышей с атрофией печени хорионического гонадотропина увеличивает количество клеток в тимусе.

Большие дозы хорионического гонадотропина увеличивают активность биоаминсодержащих клеток тимуса, угнетают пролиферативную активность лимфоцитов в культурах лимфоцитов и клеток селезенки, влияют на дифференцировку лимфоцитов, антигенпрезентацию. Хорионический гонадотропин влияет на отдельные популяции клеток. Отмечено дозозависимое угнетение гормоном супрессирующей функции Т-регуляторных лимфоцитов, разнонаправленное влияние хорионического гонадотропина на Т-киллеры.

Хорионический гонадотропин увеличивает общее количество тучных клеток и их дегранулированных форм в соединительной ткани цирротически измененной печени, влияет на развитие лимфосаркомы.

Обеспечивая формирование иммунологической толерантности при беременности, хорионический гонадотропин в концентрации 100 МЕ/мл увеличивает процентное содержание CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов. Хорионический гонадотропин является индуктором апоптоза в клетках лимфосаркомы, тормозит митоз, нормализует сниженное содержание CD4⁺ клеток в периферической крови крыс. Посредством Toll-подобных протеинов хорионический гонадотропин взаимодействует с клетками иммунной системы. Хорионический гонадотропин усиливает экспрессию маркеров CD16/CD56 натуральными киллерами и цитотоксическими лимфоцитами.

В фолликулярную фазу хорионический гонадотропин угнетает фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода моноцитами периферической крови женщин, стимулирует секрецию ИЛ-6, интерферона- α , белкового компонента липопротеидов аполипопротеина-A1, эластазы и секреторной миелопероксидазы. В лютеиновую фазу цикла хорионический гонадотропин стимулирует фагоцитоз, но угнетает продукцию активных форм кислорода.

Таким образом, вопросы, касающиеся иммуномодулирующей функции хорионического гонадотропина, актуальны и в фундаментальной, и в прикладной медицине. Определено системное действие гормона и точки его приложения к отдельным звеньям иммунитета. Однако имеющиеся работы дают представление лишь о результате действия хорионического гонадотропина, а не о конкретных процессах в центральном органе иммунной системы – тимусе, где начинается формирование популяций Т-лимфоцитов.

Вопросы для закрепления материала

1. Укажите роль хорионического гонадотропина в развитии беременности.
2. Как действует хорионический гонадотропин на иммуннокомпетентные клетки в матке?

3. Как действует хорионический гонадотропин на иммунокомпетентные клетки в селезенке?
4. Как действует хорионический гонадотропин на иммунокомпетентные клетки в тимусе?
5. Какое действие оказывает хорионический гонадотропин на лимфоциты?
6. Как действует хорионический гонадотропин на макрофаги?
7. Как действует хорионический гонадотропин на тучные клетки?
8. Синтез каких интерлейкинов зависит от хорионического гонадотропина?

Моделирование влияния хорионического гонадотропина на тимус

Для того чтобы смоделировать поступление хорионического гонадотропина в организм, необходимо определиться с объектом исследования – лабораторным животным. Лабораторные грызуны являются адекватной моделью для постановки опытов, в которых требуется получить представление о функционировании тимуса, потому что топографически в тимусе лабораторных грызунов (мышей и крыс) выделяют те же морфофункциональные зоны, что и у человека. Кроме того, распределение в тимусной дольке дендритных клеток, ответственных за селекцию Т-лимфоцитов, эпителиальных тимусных телец в тимусе грызунов соответствует таковому в тимусе детей.

Для эксперимента были выбраны небеременные самки белых лабораторных мышей одного возраста массой 25-30 г. Они содержались в обычных условиях вивария при естественном освещении и сбалансированном рационе питания.

Животные были разделены на три группы:

- I – интактная группа (n = 20);
- II – контрольная (n = 40), которым внутримышечно вводили 0,02 мл физраствора на животное 2 раза в неделю;
- III – опытная с внутримышечным введением 2 МЕ/животное раствора хорионического гонадотропина, 2 раза в неделю;

- III А – в течение одной недели (n = 10);
- III Б – в течение двух недель (n = 10);
- III В – в течение трех недель (n = 10);
- III Г – в течение четырех недель (n = 10).

Введение препаратов проводилось с соблюдением правил асептики и антисептики. Все процедуры по уходу за мышами осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267) и в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

Экспериментальный материал забирался в одно и то же время суток с 16 до 18 часов, в феврале – марте. Тимус извлекался непосредственно после декапитации животных, производилась его фиксация в 10% растворе формалина с последующей заливкой в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм были окрашены общими морфологическими, а также иммуногистохимическими методами, часть органа замораживали для последующего приготовления криостатных срезов и постановки люминесцентно-гистохимических реакций.

Для получения представления о процессах, происходящих в тимусе под действием хорионического гонадотропина, был применен следующий комплекс методов:

1. Окраска гематоксилином и эозином применялась для общей гистологической характеристики структур тимуса.

2. Для контроля состояния кислых мукополисахаридов в тучных клетках тимуса, а также определения степени их дегрануляции срезы окрашивались полихромным толудиновым синим по Унна.

3. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной. Этот метод выявляет в структурах тимуса катехоламины и серотонин.

4. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста. Данный метод выявляет клетки, содержащие гистамин.

5. Для выражения количественных уровней катехоламинов, серотонина и гистамина в микроструктурах тимуса применялся

метод цитоспектрофлуориметрии с использованием люминесцентной фотометрической насадки ФМЭЛ-1А. Интенсивность люминесценции нейроаминов измерялась в содержащих их структурах в условных единицах флуоресценции (усл. ед.).

6. Иммуногистохимический метод для выявления CD4-клеток (NovoCastra, Великобритания).

7. Иммуногистохимический метод для выявления CD8-клеток (NovoCastra, Великобритания).

8. Иммуногистохимический метод для выявления клеток, экспрессирующих маркеры Ki-67, p-53, bcl-2.

В работе применялись моно- и поликлональные антитела:

1) моноклональные антитела к маркеру клеточной пролиферации Ki-67, клон ММ-1 (NovoCastra, Великобритания);

2) поликлональные антитела к антиапоптотическому белку bcl-2 (Santa Cruze, США);

3) поликлональные антитела к белку апоптоза p-53 (Santa Cruze, США).

Иммуногистохимические исследования проводились в соответствии со стандартными протоколами.

Окрашивание проводилось ручным и аппаратным способами с использованием иммуногистохимических автоконтейнеров AUTOSTAINER-360 (THERMO, Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия).

Блокада эндогенной пероксидазы осуществлялась охлажденным 3% раствором перекиси водорода на протяжении 10 минут. С целью восстановления клеточной антигенной структуры после фиксации в формалине и заключения в парафин материала в течение 20 минут гистологические срезы выдерживались на водяной бане в 0,01 М цитратном буферном растворе (рН 6,0) при 95 °С. Инкубация с первичными антителами к белкам Ki-67, p-53, bcl-2 проводилась при комнатной температуре в течение часа. Для визуализации продуктов иммунной реакции использовался стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод («Dako», LSAB+Kit, HRP), в качестве красящего соединения применялся раствор диаминобензидина («Dako», Ligid DAB+), докраска ядер осуществлялась гематоксилином. В качестве негативного контроля использовались срезы, на ко-

торые наносились вторичные антитела без нанесения первичных антител.

Положительной экспрессией белка Ki-67, p-53 считалось наличие специфической коричневой окраски ядер клеток; положительной экспрессией bcl-2 – специфического окрашивания мембран клеток в коричневый цвет. Индекс Ki-67 и p53 вычислялся как соотношение количества специфически окрашенных ядер к количеству всех ядер в 10 полях зрения и выражался в процентах.

9. Компьютерная морфометрия. Цифровые снимки микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа Leica DM4000B с использованием цветной фотокамеры Leica DFC 425 и лицензионной программы Leica Application Suite 3.6.0. Фотографии для проведения программных морфометрических измерений были получены при увеличении микроскопа $\times 100$ и $\times 400$. Для количественных замеров интенсивности ядерной иммуногистохимической реакции выполнен подсчет числа окрашенных ядер к числу неокрашенных и перевод значений в проценты (<http://imtmicroscope.fi/immunoratio/>).

10. Морфометрический анализ заключался в измерении площадей коркового и мозгового вещества долек тимуса (увеличение объектива 10 и окуляра 10) под световым микроскопом МИКМЕД-5 с окулярным микрометром МОВ-1 и с использованием программы «Sigma Scan Pro 5.0». Для представления о количественном распределении клеток проводили их подсчет в 10 полях зрения при увеличении объектива 40 и окуляра 10.

Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel с оценкой статистической значимости различий средних величин. В зависимости от результатов проверки вариационных рядов на нормальность распределения были использованы t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни. Оценка различий качественных признаков проводилась с использованием z-критерия. Значимость различий показателей контрольных (введение физраствора) и опытных групп (введение хо-

рионического гонадотропина) между собой и по сравнению с интактной группой:

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

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

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

Вопросы для закрепления материала

1. Почему лабораторные грызуны являются адекватной моделью для постановки опытов, в которых требуется получить представление о функционировании тимуса?

2. Какие группы животных были сформированы для постановки эксперимента?

3. Как происходит извлечение тимуса?

4. Какие методы входят в комплекс, применяемый для исследования тимуса при воздействии хорионического гонадотропина?

5. Как происходит постановка иммуногистохимических реакций?

6. Что такое морфометрический анализ?

7. Между какими группами определяется статистическая значимость различий средних величин?

Глава 7. ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА МОРФОЛОГИЮ ТИМУСА

Морфологические изменения тимусной дольки

Тимус мышей при окраске гематоксилин-эозином имеет дольчатое строение, дольки имеют овально-полигональную форму. В них различимы более светлое мозговое вещество, в котором лимфоциты расположены рыхло, и более темное, с плотным расположением лимфоцитов, корковое вещество в сети из эпителиальных клеток (рис. 29). В некоторых дольках обнаруживаются эпителиальные тимусные тельца.

Между дольками тимуса мышей интактной и контрольной (введение физраствора) групп при окраске гематоксилин-эозином на разных сроках эксперимента визуальных отличий нет. Введение мышам физраствора в течение одной, двух, трех и четырех недель не отражается на морфометрических показателях долек тимуса.

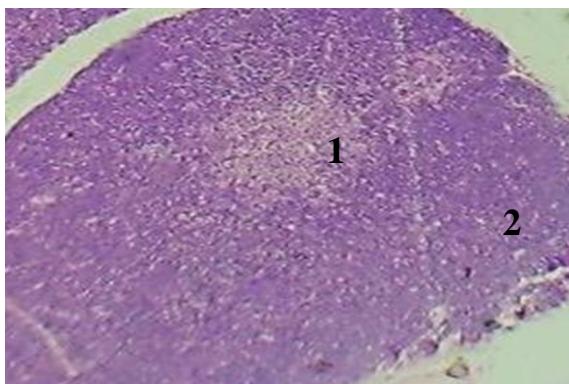


Рис. 29. Долька тимуса мыши интактной группы.
Окраска гематоксилин-эозином: 1 – мозговое вещество, 2 – корковое
вещество. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10, ок. 10

Введение хорионического гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель изменяет морфологию долек тимуса: после введения гормона в течение месяца в дольках тимуса мышей визуально наблюдается увеличение площади мозгового вещества долек, что подтверждается морфометрией (рис. 30).

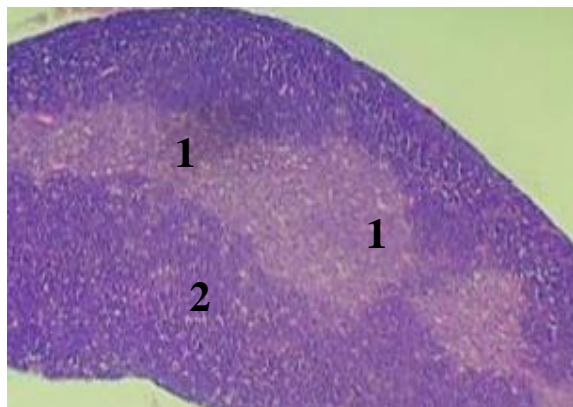


Рис. 30. Долька тимуса мыши, получавшей хорионический гонадотропин в течение четырех недель.

Окраска гематоксилин-эозином: 1 – мозговое вещество, 2 – корковое вещество. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 10, ок. 10

На всех сроках введения хорионический гонадотропин увеличивает среднюю площадь мозгового вещества долек тимуса мышей (табл. 7, 8).

Средняя площадь мозгового вещества долек тимуса мышей контрольной и опытных групп составляет для срока одна неделя $222,4 \pm 52,4$ и $723 \pm 26,6$ μm^2 , для двух и трех недель введения хорионического гонадотропина – $223,3 \pm 34,4$ и $905 \pm 22,2$ μm^2 и $229,4 \pm 48,6$ и $866,2 \pm 78,8$ μm^2 соответственно, для четырех недель введения хорионического гонадотропина – $220,5 \pm 91,4$ и $320,4 \pm 32,9$ μm^2 ($p < 0,05$).

При этом общая площадь дольки имеет тенденцию к некоторому увеличению.

Таблица 7

Морфометрические показатели долек тимуса мышей
интактной, контрольной и опытной групп, мкм^2 ($M \pm m$)

Морфофункциональная зона долек тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Срок опытов, недель				
	интактные	одна		две	
		ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
Корковое вещество	4099,0 \pm 818,8	4133,0 \pm 318,2	4038,0 \pm 358,1	4340,9 \pm 228,7	4075,9 \pm 797,9
Мозговое вещество	226,9 \pm 15,0	723,0 \pm 26,6*	222,4 \pm 52,4	905,0 \pm 22,2*	223,3 \pm 34,4
Общая площадь дольки	4326,5 \pm 808,6	5917,0 \pm 513,7*	4310,4 \pm 410,5	5245,9 \pm 2 32,1	4319,2 \pm 832,3

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

Таблица 8

Морфометрические показатели долек тимуса мышей
интактной, контрольной и опытной групп, мкм^2 ($M \pm m$)

Морфофункциональная зона долек тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Срок опытов, недель				
	интактные	три		четыре	
		ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
Корковое вещество	4099,0 \pm 818,8	3827,5 \pm 351,2	4075,6 \pm 508,5	3759,0 \pm 516,2	4097,1 \pm 274,1
Мозговое вещество	226,9 \pm 15,0	866,2 \pm 78,8*	229,4 \pm 48,6	320,4 \pm 32,9*	220,5 \pm 91,4
Общая площадь дольки	4326,5 \pm 808,6	4693,7 \pm 371,5	4365,0 \pm 557,1	4079,4 \pm 505,5*	4327,6 \pm 365,5

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

При введении хорионического гонадотропина наблюдается изменение морфологии долек тимуса за счет абсолютного и относительного увеличения площади в них мозгового вещества.

Вопросы для закрепления материала

1. Отражается ли введение физиологического раствора на морфологии тимусной дольки?
2. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на морфологии тимусной дольки?
3. Какие визуальные морфологические отличия характеризуют тимус после введения хорионического гонадотропина?
4. Как зависят морфометрические показатели долек тимуса от сроков введения физиологического раствора?
5. Как зависят морфометрические показатели долек тимуса от сроков введения хорионического гонадотропина?
6. На каком сроке введения хорионического гонадотропина наблюдается самый выраженный эффект влияния хорионического гонадотропина на мозговое вещество тимусной дольки?
7. На каком сроке введения хорионического гонадотропина наблюдается самый выраженный эффект влияния хорионического гонадотропина на корковое вещество тимусной дольки?

Характеристика тучных клеток тимуса

Для изучения популяции тучных клеток в тимусе используется гистохимический метод окраски толуидиновым синим по методу Унна. Этот метод позволяет судить и о качественных изменениях, связанных с накоплением в тучных клетках сульфатированных гликозаминогликанов, что имеет непосредственное отношение к содержанию нейромедиаторных биогенных аминов в микроокружении созревающих Т-лимфоцитов.

У мышей лимфоциты коркового и мозгового вещества долек тимуса окрашиваются в голубой цвет, и корковое вещество немного темнее мозгового. Тучные клетки в корковом и мозговом веществе долек, а также в междольковых корковых перегородках тимуса окрашиваются толуидиновым синим по Унна с различной степенью метахромазии (рис. 31, 32).

Количество тучных клеток при увеличении $\times 900$ в поле зрения сопоставимо для мышей интактной и контрольных групп и составляет в корковом и мозговом веществе долек тимуса 2–3 клетки в поле зрения, в корковых перегородках – 4–5 клеток

в поле зрения. При введении гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель количество тучных клеток в поле зрения в корковом и мозговом веществе долек тимуса мышей составляет $2,8 \pm 0,3$; $3,0 \pm 0,5$; $3,6 \pm 0,4$; $4,0 \pm 0,7$ клеток соответственно, а в соединительнотканых корковых перегородках – $4,8 \pm 0,8$; $4,8 \pm 0,6$; $5,6 \pm 0,6$ и $6,4 \pm 0,9$ клеток соответственно.

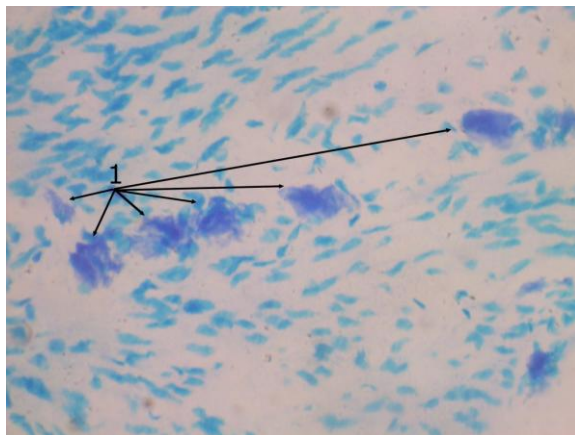


Рис. 31. Тучные клетки тимуса мыши интактной группы. Окраска толуидиновым синим по Унна. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40, ок. 10

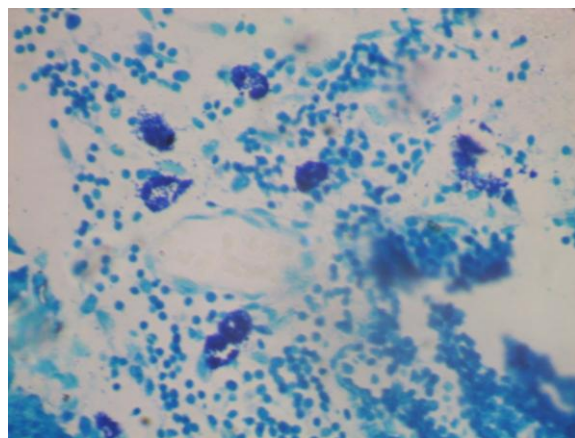


Рис. 32. Тучные клетки тимуса мыши с введением хорионического гонадотропина в течение четырех недель. Окраска толуидиновым синим по Унна. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40, ок. 10

Классификация тучных клеток по степени метахромазии и по степени дегрануляции уже была приведена в главе 4, однако, уместно повторить её и в данном разделе.

Классификация тучных клеток по метахромазии:

- α – ортохромные (с цитоплазмой голубого цвета);
- β_1 -метахроматичные (имеют гранулы темно-синего цвета);
- β_2 - метахроматичные (с фиолетовыми гранулами);
- β_3 - метахроматичные (с красно-фиолетовыми гранулами);
- γ - метахроматичные (имеют пурпурные гранулы).

Классификация по степени дегрануляции:

T_0 -формы – клетки с плотно расположенными гранулами;

T_1 -формы – клетки с визуализирующимся ядром, гранулы не выделяются за пределы цитолеммы;

T_2 -формы – с четким ядром и гранулами, расположенными внутри клетки и за ее пределами;

T_3 -формы – клетки с разрушенной цитолеммой, единичными гранулами в цитоплазме и вышедшими за пределы цитомембраны.

Распределение тучных клеток по степени метахромазии в корковом и мозговом веществе долек тимуса и в соединительнотканых корковых перегородках приведено на рис. 33, 34, а по степени дегрануляции – на рис. 35, 36.

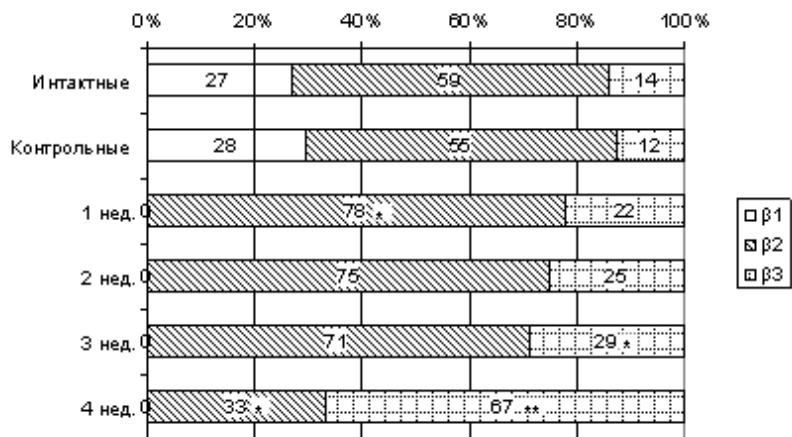


Рис. 33. Характеристика популяции тучных клеток в соединительнотканых корковых перегородках тимуса мышей интактной, контрольной и опытной групп, %. * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,001$

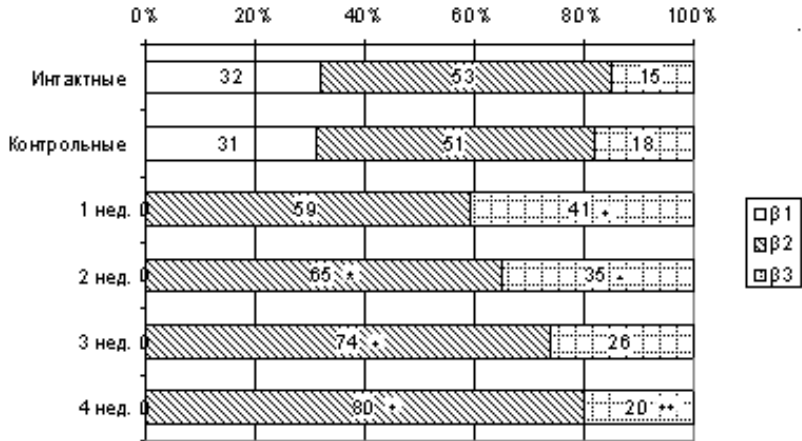


Рис. 34. Характеристика популяции тучных клеток коркового и мозгового вещества долей тимуса мышей интактной, контрольной и опытной групп, %. * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,001$

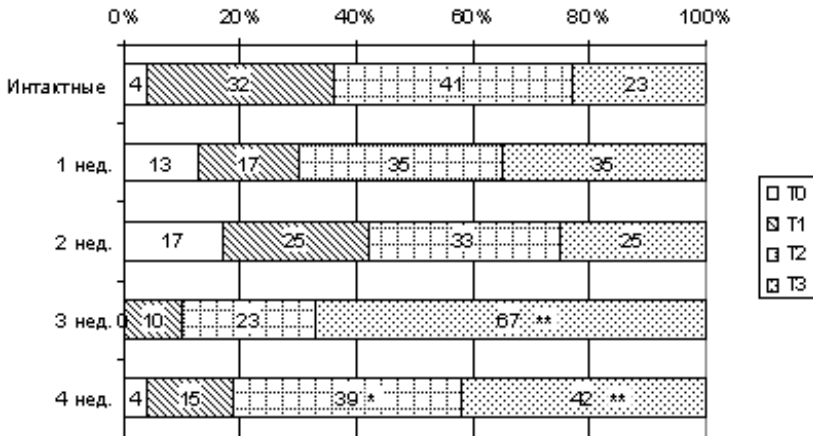


Рис. 35. Структура популяции тучных клеток междольковых корковых перегородок тимуса интактных животных и при воздействии хорионического гонадотропина. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$

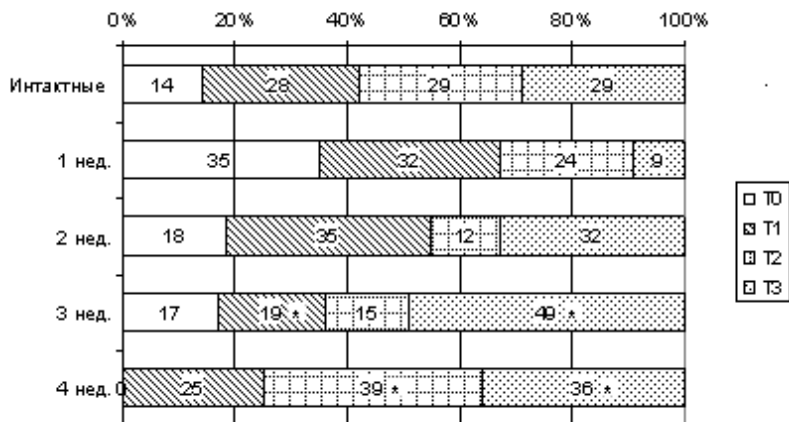


Рис. 36. Структура популяции тучных клеток коркового и мозгового вещества долек тимуса интактных животных и при воздействии хорионического гонадотропина. * – $p \leq 0,05$

У мышей в норме и при воздействиях, близких к физиологическим, α - и γ -метахроматичные тучные клетки не обнаруживаются. Введение хорионического гонадотропина увеличивает процентное содержание тучных клеток с β_2 - и β_3 -метахромазией, их доля зависит от срока воздействия гормона.

В соединительнотканых корковых перегородках происходит постепенное нарастание количества тучных клеток со степенью метахромазии β_3 , а в корковом и мозговом веществе долек тимуса – со степенью метахромазии β_2 . У мышей, получавших хорионический гонадотропин, β_1 -метахроматичные клетки в тимусе не обнаруживаются.

Поступление гормона в течение четырех недель сопровождается увеличением количества T_2 -форм с признаками дегрануляции, количество T_3 -форм постепенно уменьшается при сравнении с данными трехнедельного эксперимента.

Следовательно, введение хорионического гонадотропина отражается на количественных и качественных характеристиках тучных клеток в тимусе мышей. С увеличением времени воздействия гормона в поле зрения возрастает количество тучных клеток, что сопровождается увеличением степени их метахромазии и дегрануляции.

Вопросы для закрепления материала

1. Что такое тинкториальные свойства тучных клеток?
2. Отражается ли введение физиологического раствора на тинкториальных свойствах тучных клеток?
3. Чем обуславливается метахромазия тучных клеток?
4. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на метахромазии тучных клеток?
5. Что такое дегрануляция тучных клеток?
6. На какие группы делятся тучные клетки по степени дегрануляции?
7. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на дегрануляции тучных клеток?
8. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на метахромазии тучных клеток?
9. Зависит ли степень метахромазии тучных клеток от времени поступления гормона?
10. Зависит ли степень дегрануляции тучных клеток от времени поступления гормона?
11. Чем отличается реакция тучных клеток соединительнотканых корковых перегородок от реакции тучных клеток паренхимы тимуса по степени дегрануляции?
12. Чем отличается реакция тучных клеток соединительнотканых корковых перегородок от реакции тучных клеток паренхимы тимуса по степени метахромазии?
13. Одинаково ли тучные клетки соединительнотканых корковых перегородок и паренхимы тимуса реагируют на введение хорионического гонадотропина?
14. Как можно соотнести между собой степень дегрануляции и степень метахромазии тучных клеток?

Глава 8. ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА БИОАМИНСОДЕРЖАЩИЕ СТРУКТУРЫ ТИМУСА

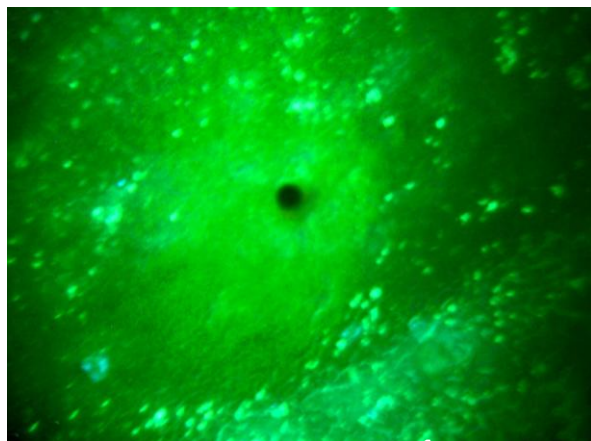
Влияние хорионического гонадотропина на структуры тимуса, содержащие катехоловые амины

Для выявления катехоламинсодержащих структур тимуса применяется люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной. У интактных животных катехоламины определяются во всех микроструктурах тимусной долики.

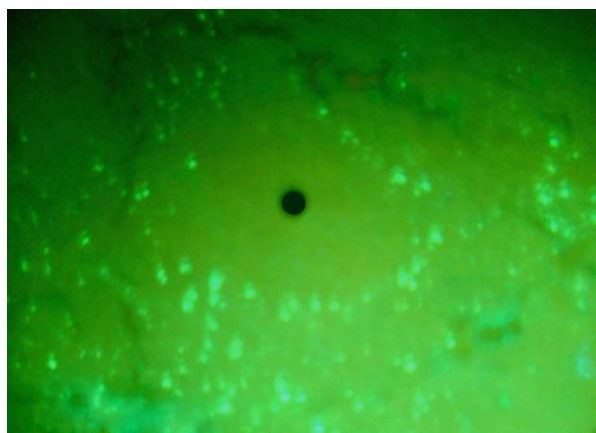
Люминесцирующие гранулосодержащие клетки (ЛГК) между корковым веществом (КВ) и мозговым веществом (МВ) располагаются компактно вокруг мозгового вещества долики (рис. 37, *а*). При большом увеличении ($\times 900$) в этих клетках видны отдельные беловато-желтые гранулы. Гранулы содержат и люминесцирующие клетки коркового вещества долек тимуса, однако визуально эти клетки имеют меньшие размеры.

Введение физраствора на разных сроках эксперимента не отражается на люминесцентно-морфологической картине долек тимуса мышей. Введение хорионического гонадотропина изменяет люминесцентную морфологию долики: появляется второй ряд люминесцирующих клеток на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса (рис. 37, *б*).

В междольковых корковых перегородках, на границе коркового и мозгового вещества, а также среди тимоцитов коркового и мозгового вещества на территории долек выявляются люминесцирующие клетки, которые содержат большое количество одинаковых по размеру беловато-желтых гранул. Свечение гранул ярко-желтое, в связи с наличием большого количества гранул в клетках не вырисовывается ядро. Эти клетки по своим морфологическим характеристикам соответствуют тучным клеткам. Тучные клетки располагаются также в капсуле тимуса, по ходу кровеносных сосудов. У мышей-самок интактной группы определяются одиночные или сгруппированные тучные клетки вне связи с кровеносными сосудами.



a



б

Рис. 37. Тимус мыши. Люминесцирующие гранулярные клетки на границе коркового и мозгового вещества:
a – интактные животные; *б* – введение хорионического гонадотропина в течение четырех недель. Метод Фалька-Хилларпа. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Увеличение $\times 400$

Нервно-сосудистые сплетения находятся в капсуле тимуса, а также в соединительнотканых корковых перегородках. Катехоламинсодержащие нервные волокна в дольках тимуса

проникают в адвентицию сосудов мелкого калибра. Нервные окончания изумрудно-зеленого цвета располагаются в корковом веществе долек тимуса в непосредственной близости с ЛГК между корковым и мозговым веществом и ЛГК коркового вещества.

Нейроамины по ходу нервного волокна распределяются не одинаково, в больших количествах они концентрируются в варикозных расширениях (рис. 38).

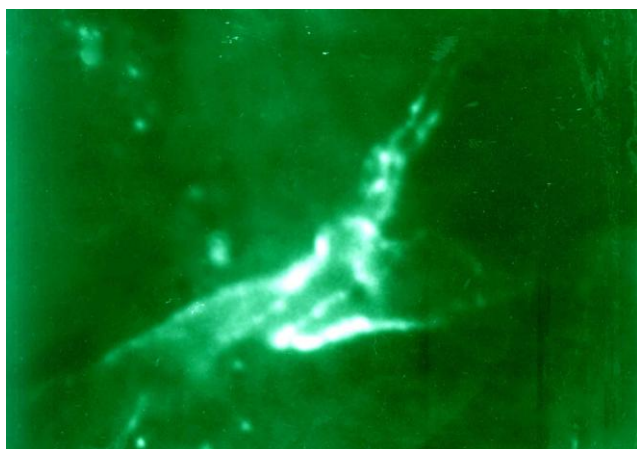


Рис. 38. Тимус мыши. Адренергические нервные волокна. Метод Фалька-Хилларпа. Введение хорионического гонадотропина в течение четырех недель. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Увеличение $\times 900$

Введение гормона отражается на интенсивности люминесценции катехоламинов в структурах тимуса лабораторных мышей, причем показатели для интактной группы и всех контрольных групп являются сопоставимыми (табл. 9, 10).

Воздействие хорионического гонадотропина в течение одной недели приводит к снижению интенсивности люминесценции катехоламинов в микроструктурах тимуса по сравнению с данными для интактной группы. В ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса интенсивность люминесценции катехоламинов снижена в 3,3 раза, в ЛГК коркового вещества – в 2 раза, в лимфоцитах мозгового вещества – в 2,5 раза, в

лимфоцитах коркового вещества – в 2,6 раза, в адренергических нервах – в 1,2 раза, в тучных клетках – в 2,7 раза.

После двух недель введения гормона также наблюдается снижение интенсивности люминесценции катехоламинов в микроструктурах тимуса по сравнению с данными для интактной группы. Так, в тучных клетках интенсивность люминесценции катехоловых аминов снижается в 1,5 раза. В ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса интенсивность люминесценции снижается в 1,8 раза, в ЛГК коркового вещества долек – в 1,3 раза, в лимфоцитах коркового вещества в 1,9 раза.

Таблица 9

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

Структура тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Ин-такт-ные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
		Срок опытов			
		одна неделя		две недели	
ЛГК на границе коркового и мозгового вещества	8,80 \pm 2,59	3,60 \pm 0,13** $p_n < 0,001$	8,10 \pm 0,24	4,83 \pm 1,92** $p_n < 0,001$	8,45 \pm 1,34
ЛГК коркового вещества долек	7,84 \pm 1,38	3,59 \pm 0,18** $p_n < 0,001$	7,15 \pm 0,36	6,27 \pm 2,43** $p_n < 0,001$	7,50 \pm 2,08
Лимфоциты мозгового вещества долек	8,67 \pm 2,69	3,47 \pm 0,12** $p_n < 0,001$	8,20 \pm 0,18	8,25 \pm 0,24** $p_n < 0,001$	8,45 \pm 1,06
Лимфоциты коркового вещества долек	9,90 \pm 0,55	3,81 \pm 0,27* $p_n < 0,001$	9,55 \pm 0,46	5,29 \pm 2,09** $p_n < 0,001$	9,35 \pm 0,78
Тучные клетки	9,90 \pm 1,70	3,61 \pm 0,23** $p_n < 0,001$	10,20 \pm 1,69	6,44 \pm 1,64**	10,15 \pm 3,99
Адренергические нервы	6,90 \pm 0,86	5,95 \pm 2,00*	6,40 \pm 1,51	7,90 \pm 1,11*	6,70 \pm 2,99

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

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

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

Таблица 10

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

Структура тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Интактные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
		Срок опытов			
		три недели		четыре недели	
ЛГК на границе коркового и мозгового вещества	8,80± 2,59	2,73± 0,90**	8,70± 0,75	3,49± 0,07 $p_n < 0,05$	7,85± 0,67
ЛГК коркового вещества долек	7,84± 1,38	2,49± 0,79**	7,00± 0,75	3,49± 0,11	7,20± 0,73
Лимфоциты мозгового вещества долек	8,67± 2,69	2,88± 0,73** $p_n < 0,001$	8,75± 0,28	3,52± 0,08 $p_n < 0,001$	8,55± 0,97
Лимфоциты коркового вещества долек	9,90± 0,55	3,25± 0,07** $p_n < 0,05$	9,60± 0,22	3,54± 0,07** $p_n < 0,001$	9,60± 0,73
Тучные клетки	9,90± 1,70	2,15± 0,78** $p_n < 0,001$	9,35± 0,29	3,74± 0,19** $p_n < 0,001$	10,2± 1,80
Адренергические нервы	6,90± 0,86	3,45± 0,93* $p_n < 0,001$	5,90± 0,29	2,80± 1,39 $p_n < 0,001$	5,87± 0,88

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

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

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

При введении хорионического гонадотропина в течение трех недель интенсивность люминесценции катехоламинов остается сниженной: в ЛГК на границе коркового вещества и мозгового вещества и ЛГК коркового вещества – в 3 раза, в тучных клетках – в 4,6 раза. В лимфоцитах мозгового и коркового вещества долек – в 3 раза. В адренергических нервах тимуса интенсивность люминесценции катехоламинов снижается в 2 раза.

На четвертой неделе воздействия хорионического гонадотропина сохраняется снижение интенсивности люминесценции катехоламинов во всех биоаминсодержащих структурах: в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса – в 2,5 раза, в ЛГК коркового вещества – в 2,2 раза, в тучных клетках – в 2,6 раза, в адренергических нервах – в 2,4 раза, в лимфоцитах мозгового вещества – в 2,5 раза, в лимфоцитах коркового вещества – в 2,6 раза.

По сравнению с интактными и контрольными животными у мышей, получавших хорионический гонадотропин, интенсивность люминесценции катехоламинов в нервных терминалях снижается в 1,2 раза, в 2 раза, в 2,5 раза после воздействия гормона в течение одной, трех, четырех недель соответственно.

Реакция клеток, содержащих катехоловые амины, на введение хорионического гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель заключается в преимущественном снижении в них интенсивности люминесценции катехоламинов; в адренергических нервных волокнах интенсивность люминесценции катехоламинов снижается, исключение составляет срок две недели, на котором интенсивность люминесценции катехоловых аминов незначительно повышается.

Вопросы для закрепления материала

1. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции катехоловых аминов в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса?

2. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции катехоловых аминов в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса?

3. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции катехоловых аминов в ЛГК коркового вещества долек тимуса?

4. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции катехоловых аминов в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса?

5. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции катехоловых аминов в ЛГК коркового вещества долек тимуса?

6. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции катехоловых аминов в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса?

7. Имеется ли зависимость интенсивности люминесценции катехоловых аминов в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

8. Имеется ли зависимость интенсивности люминесценции катехоловых аминов в ЛГК коркового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

9. Имеется ли зависимость интенсивности люминесценции катехоловых аминов в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

10. Имеется ли зависимость интенсивности люминесценции катехоловых аминов в тучных клетках от времени поступления гормона?

11. Имеется ли зависимость интенсивности люминесценции катехоловых аминов в адренергических нервах от времени поступления гормона?

12. Как распределяются нейроамины по ходу нервного волокна?

Влияние хорионического гонадотропина на структуры тимуса, содержащие серотонин

Для выявления структур тимуса, содержащих серотонин, применяется люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной. В тимусе мышей серотонин содержится в следующих структурах: в ЛГК коркового вещества долек тимуса, ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек, тучных клетках и терминальных нервных волокнах.

При увеличении с использованием иммерсионного объектива ($\times 900$) можно рассмотреть в гранулосодержащих клетках отдельные гранулы. Их цвет варьирует от белого до желтого, с разными оттенками. ЛГК коркового вещества долек тимуса визуально имеют меньшие размеры, чем ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса.

Крупные люминесцирующие клетки в корковых перегородках, содержащие большое количество одинаковых по размеру гранул, имеют морфологию тучных клеток. В большинстве препаратов визуализируются тонкие нервные терминали – зеленоватые «ниточки».

Введение физиологического раствора на разных сроках эксперимента не изменяет люминесцентную морфологию тимусной дольки мышей.

Введение хорионического гонадотропина приводит к появлению второго ряда ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса. Кроме того, фиксируется наличие выростов коркового вещества после четырех недель воздействия хорионического гонадотропина.

Люминесцентная морфология тимусной дольки при характеристике серотонинсодержащих структур совпадает с таковой при характеристике структур, содержащих катехоловые биогенные амины, потому что для выявления этих биогенных аминов используется один и тот же метод – метод Фалька-Хилларпа.

Хорионический гонадотропин изменяет интенсивность люминесценции серотонина во всех серотонинсодержащих клетках и структурах долек тимуса белых лабораторных мышей (табл. 11, 12). Данные для интактной и всех контрольных групп являются сопоставимыми.

Снижение интенсивности люминесценции серотонина наблюдается с первой недели воздействия хорионического гонадотропина. Так, в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек ее показатели в группе мышей, получавших хорионический гонадотропин, снижаются по сравнению с интактными животными в 2 раза, в ЛГК коркового вещества долек – в 2 раза, в лимфоцитах мозгового и коркового вещества – в 2,4 и в 2,5 раза соответственно, в тучных клетках – в 2,7 раза, в адренергических нервах – в 2,7 раза.

На второй неделе воздействия хорионического гонадотропина наблюдается увеличение интенсивности люминесценции серотонина во всех серотонинсодержащих структурах тимусной дольки, однако в тучных клетках, нервных волокнах и лимфоцитах коркового вещества долек тимуса она, по сравнению с показателями для контрольных и интактных животных, остается сниженной.

После трех недель введения хорионического гонадотропина в структурах тимусной дольки мышей регистрируется «вторая волна» уменьшения, по сравнению с интактными животными, интенсивности люминесценции серотонина, в ЛГК на границе коркового мозгового вещества долек – в 2,7 раза, в ЛГК коркового вещества – в 2,9 раза, в лимфоцитах мозгового вещества – в 2,9 раза, в лимфоцитах коркового вещества – в 3 раза. В тучных клетках и нервных волокнах интенсивность люминесценции серотонина снижается в 4,6 и 1,2 раза соответственно.

Таблица 11

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

Структура тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Ин-такт-ные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
		Срок опытов			
		одна неделя		две недели	
ЛГК на границе коркового и мозгового вещества	7,25± 2,55	3,59± 0,14** $p_n < 0,001$	7,80± 0,18	7,23± 2,26** $p_n < 0,001$	7,85± 1,71
ЛГК коркового вещества долек	7,06± 1,41	3,60± 0,19** $p_n < 0,001$	7,85± 0,82	6,25± 2,71** $p_n < 0,05$	6,85± 2,70
Лимфоциты мозгового вещества долек	8,23± 1,68	3,42± 0,11** $p_n < 0,001$	8,10± 0,13	9,08± 2,69** $p_n < 0,001$	7,95± 0,52
Лимфоциты коркового вещества долек	9,4± 0,30	3,73± 0,20*	9,15± 0,67	4,50± 1,29** $p_n < 0,001$	8,85± 0,38
Тучные клетки	9,1± 2,92	3,43± 0,15** $p_n < 0,001$	8,90± 2,40	6,96± 1,64** $p_n < 0,05$	9,0± 3,03
Адренергические нервы	4,75± 1,46	1,70± 0,45** $p_n < 0,001$	4,75± 0,57	4,50± 0,46	4,85± 1,49

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

** – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,001$; p_n – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,05$ и $p < 0,001$

Таблица 12

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

Структура тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Ин-такт-ные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
		Срок опытов			
		три недели		четыре недели	
ЛГК на границе коркового и мозгового вещества	7,25± 2,55	2,65± 0,96** $p_n < 0,05$	7,90± 0,53	3,43± 0,06 $p_n < 0,05$	7,05± 0,98
ЛГК коркового вещества долек	7,06± 1,41	2,4± 0,85** $p_n < 0,05$	7,00± 0,60	3,47± 0,08 $p_n < 0,05$	7,05± 0,94
Лимфоциты мозгового вещества долек	8,23± 1,68	2,85± 0,72**	7,20± 0,18	3,43± 0,1 $p_n < 0,001$	7,40± 0,63
Лимфоциты коркового вещества долек	9,4± 0,30	3,12± 0,04** $p_n < 0,001$	8,89± 0,27	3,41± 0,06** $p_n < 0,001$	8,15± 0,48
Тучные клетки	9,1± 2,92	2,0± 0,82**	9,05± 0,36	3,59± 0,17	8,78± 1,30
Адренергические нервы	4,75± 1,46	2,20± 0,30** $p_n < 0,05$	4,95± 0,22	2,20± 0,60 $p_n < 0,05$	4,45± 0,82

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

** – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,001$; p_n – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,05$ и $p < 0,001$

Дальнейшее введение хорионического гонадотропина (четыре недели) существенно не изменяет интенсивность люминесценции серотонина в структурах тимуса мышей опытных групп по сравнению с трехнедельными сроками воздействия хорионического гонадотропина.

По сравнению с интактными и контрольными животными у мышей с введением хорионического гонадотропина в течение одной, трех, четырех недель отмечается снижение содержания серотонина в варикозных расширениях адренергических нервных волокон: в 2,8; 2,2; 2,2 раза соответственно.

Характер изменения интенсивности люминесценции серотонина и катехоламинов в биоаминсодержащих структурах тимуса сходен – на третьей неделе воздействия наблюдается «вторая волна» снижения интенсивности люминесценции в подавляющем большинстве структур, содержащих эти биоамины.

Введение хорионического гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель приводит к преимущественному снижению интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества, ЛГК коркового вещества, лимфоцитах коркового вещества, тучных клетках и адренергических нервах тимуса, однако в лимфоцитах мозгового вещества долек тимуса интенсивность люминесценции серотонина повышается при введении гормона в течение двух недель.

Вопросы для закрепления материала

1. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции серотонина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса?

2. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции серотонина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса?

3. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК коркового вещества долек тимуса?

4. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса?

5. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК коркового вещества долек тимуса?

6. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса?

7. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

8. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК коркового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

9. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции серотонина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

10. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции серотонина в тучных клетках от времени поступления гормона?

11. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции серотонина в адренергических нервах от времени поступления гормона?

Влияние хорионического гонадотропина на клетки тимуса, содержащие гистамин

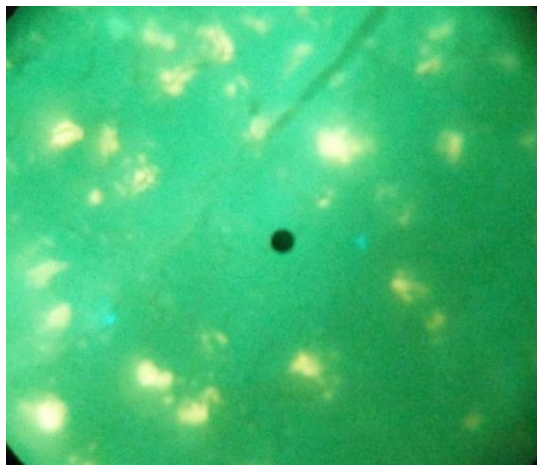
Для выявления гистаминсодержащих клеток тимуса применяется люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвана, Роста.

Гистаминсодержащие ЛГК определяются в корковом веществе долек тимуса лабораторных мышей – это мелкие, неправильной формы клетки, в которых видны отдельные желтые и беловато-желтые гранулы. ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса визуальнее крупнее, они образуют ряд вокруг мозгового вещества, форма этих клеток неправильная, среди них встречаются как округлые, так и полигональной формы клетки. Отличительной особенностью этих клеток является наличие ярких желтовато-белых гранул с лимонным оттенком (рис. 39).

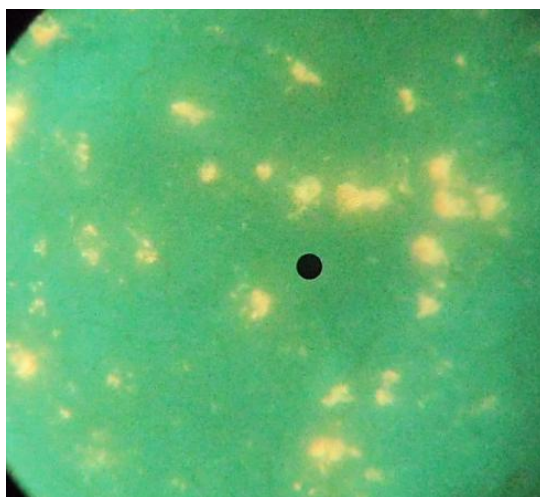
В соединительнотканых междольковых корковых перегородках обнаруживаются клетки, имеющие морфологию тучных клеток: крупные, преимущественно овальные, клетки, содержащие множественные ярко-желтые субтильные гранулы.

Поступление физраствора на разных сроках воздействия не отражается на люминесцентной морфологии тимусных долек.

2



a



б

Рис. 39. Тимус мыши. Люминесцирующие гранулярные клетки: *a* – intactные животные, *б* – введение хорионического гонадотропина в течение четырех недель; 1 – ЛГК на границе между корковым и мозговым веществом; 2 – ЛГК коркового вещества. Метод Кросса, Эвана, Роста. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Увеличение $\times 900$

Интенсивность люминесценции гистамина в структурах тимуса мышей интактных, контрольных и опытных групп свидетельствует о влиянии хорионического гонадотропина на содержание гистамина в клетках тимусной дольки (табл. 13, 14).

Через одну неделю после введения хорионического гонадотропина интенсивность люминесценции гистамина возрастает в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек в 1,6 раза, в ЛГК коркового вещества – в 1,5 раза, в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек – в 2 раза и в 1,4 раза соответственно, в тучных клетках – в 2 раза по сравнению с показателями мышей интактной группы.

Таблица 13

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

Структура тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Ин-такт-ные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
		Срок опытов			
		одна неделя		две недели	
ЛГК на границе коркового и мозгового вещества	3,88 \pm 0,23	6,09 \pm 0,31** $p_n < 0,001$	3,70 \pm 0,13	3,94 \pm 0,32** $p_n < 0,001$	3,75 \pm 1,05
ЛГК коркового вещества долек	3,55 \pm 0,16	5,29 \pm 0,45** $p_n < 0,001$	3,65 \pm 0,10	3,8 \pm 0,31** $p_n < 0,001$	3,55 \pm 2,23
Лимфоциты мозгового вещества долек	3,29 \pm 0,16	4,61 \pm 0,15 $p_n < 0,001$	3,35 \pm 0,00	3,46 \pm 0,25** $p_n < 0,001$	3,35 \pm 0,33
Лимфоциты коркового вещества долек	2,43 \pm 0,73	4,82 \pm 0,22** $p_n < 0,001$	2,40 \pm 0,13	3,6 \pm 0,21** $p_n < 0,001$	2,95 \pm 0,75
Тучные клетки	2,79 \pm 0,81	5,95 \pm 0,61** $p_n < 0,001$	2,70 \pm 0,13	4,23 \pm 0,47** $p_n < 0,001$	2,65 \pm 0,08

* – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,05$;
** – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,001$; p_n – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,05$ и $p < 0,001$

Таблица 14

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

Структура тимуса	Группа экспериментальных мышей				
	Ин-такт-ные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
		Срок опытов			
		три недели		четыре недели	
ЛГК на границе коркового и мозгового вещества	3,88± 0,23	6,39± 0,41** $p_n < 0,001$	3,69± 0,41	3,58± 0,18** $p_n < 0,001$	3,85± 5,35
ЛГК коркового вещества долек	3,55± 0,16	6,46± 0,61** $p_n < 0,001$	3,46± 0,61	3,72± 0,37** $p_n < 0,001$	3,73± 2,38
Лимфоциты мозгового вещества долек	3,29± 0,16	6,33± 0,4** $p_n < 0,05$	3,30± 1,44	3,61± 0,21** $p_n < 0,001$	3,65± 0,69
Лимфоциты коркового вещества долек	2,43± 0,73	6,56± 0,46** $p_n < 0,001$	2,40± 1,38	3,39± 0,19** $p_n < 0,001$	2,25± 1,00
Тучные клетки	2,79± 0,81	6,61± 0,79** $p_n < 0,001$	2,70± 1,0,5	3,61± 0,26** $p_n < 0,001$	2,65± 0,97

* – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,05$;
** – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,001$; p_n – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,05$ и $p < 0,001$

На второй неделе интенсивность люминесценции диамина снижается по сравнению с показателями на сроке введения хорионического гонадотропина в течение одной недели: в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса – $3,94 \pm 0,32$ усл. ед., ЛГК коркового вещества – $3,80 \pm 0,31$; в лимфоцитах мозгового вещества – $3,46 \pm 0,25$, в лимфоцитах коркового вещества – $3,60 \pm 0,21$; в тучных клетках – $4,23 \pm 0,47$ усл. ед.

Через три недели после введения хорионического гонадотропина интенсивность люминесценции гистамина повышается во всех содержащих его клетках тимусной дольки: в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества – в 1,6 раза; в ЛГК

коркового вещества – в 1,8 раза; в лимфоцитах мозгового вещества – в 1,9 раза; в лимфоцитах коркового вещества – в 2,7 раза; в тучных клетках – в 2,3 раза по сравнению с показателями мышей интактной группы.

При введении хорионического гонадотропина в течение четырех недель содержание диамина снижается: в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества – $3,58 \pm 0,18$ усл. ед.; в ЛГК коркового вещества – $3,72 \pm 0,37$; в лимфоцитах мозгового вещества $3,61 \pm 0,21$; в лимфоцитах коркового вещества – $3,39 \pm 0,19$; в тучных клетках – $3,61 \pm 0,26$ усл. ед.

Колебание интенсивности люминесценции гистамина во всех содержащих его клетках тимуса сходно, оно имеет волнообразный характер.

Введение хорионического гонадотропина приводит к повышению интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса, в ЛГК коркового вещества, в лимфоцитах коркового и мозгового вещества и в тучных клетках, причем пики повышения количественного содержания диамина обнаружены на первой и третьей неделях введения гормона.

Вопросы для закрепления материала

1. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции гистамина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса?

2. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции гистамина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса?

3. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК коркового вещества долек тимуса?

4. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса?

5. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК коркового вещества долек тимуса?

6. Отражается ли введение физиологического раствора на интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса?

7. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

8. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК коркового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

9. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции гистамина в тучных клетках от времени поступления гормона?

10. Есть ли зависимость интенсивности люминесценции гистамина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса от времени поступления гормона?

Взаимоотношение интенсивности люминесценции нейромедиаторных биогенных аминов в тимусе

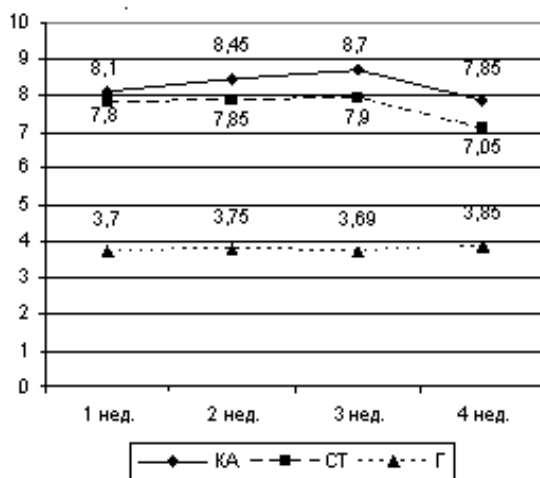
Графическое изображение изменения интенсивности люминесценции катехоламинов, серотонина и гистамина в зависимости от сроков введения хорионического гонадотропина в биоаминсодержащих структурах тимусной дольки позволяет соотнести интенсивность люминесценции биогенных аминов в динамике (рис. 40, 41, 42).

Введение физиологического раствора (рис. 40, 41, 42) не приводит к изменению интенсивности люминесценции каждого из изучаемых биогенных аминов в структурах тимусной дольки.

Колебания интенсивности люминесценции катехоламинов и серотонина в лимфоцитах коркового и мозгового вещества долек тимуса, ЛГК коркового вещества долек и тучных клетках почти идентичны: на первой и третьей неделях воздействия хорионического гонадотропина наблюдается спад интенсивности их люминесценции.

В адренергических нервах имеет место сходный характер изменения интенсивности люминесценции катехоламинов и серотонина.

Контрольная группа



Опытная группа

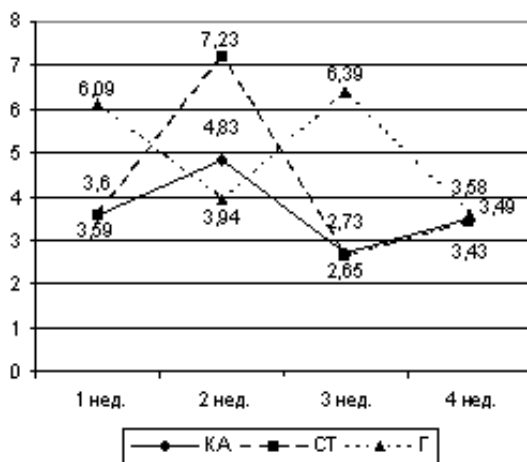
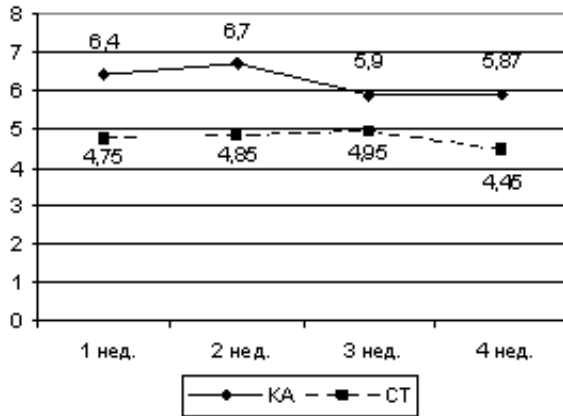


Рис. 40. Интенсивность люминесценции катехоламинов, серотонина и гистамина в ЛГК между корковым и мозговым веществом долек тимуса мышей опытной и контрольной групп, усл. ед., $\times 10^2$

Контрольная группа



Опытная группа

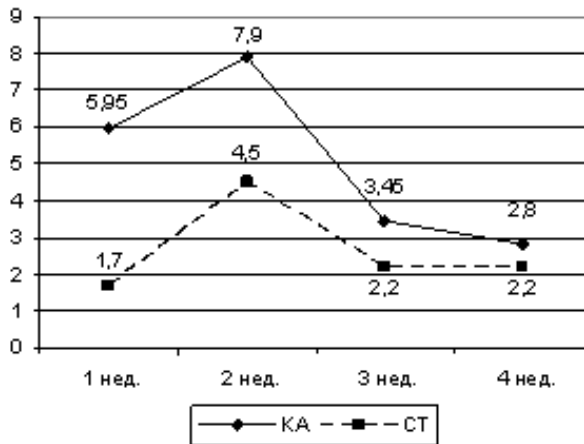
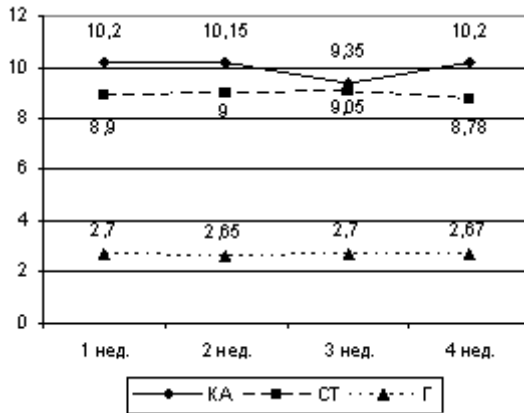


Рис. 41. Интенсивность люминесценции катехоламинов и серотонина в адренергических нервах тимуса мышей опытной и контрольной групп, усл. ед., $\times 10^2$

Контрольная группа



Опытная группа

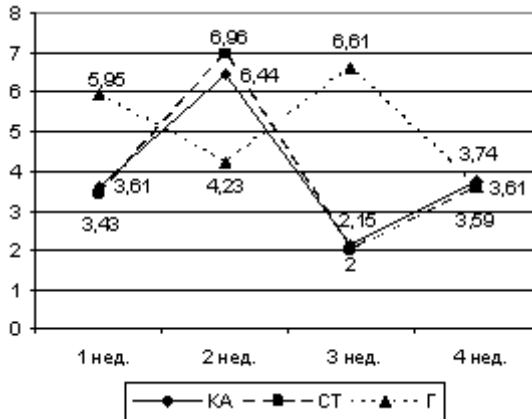


Рис. 42. Интенсивность люминесценции катехоламинов, серотонина и гистамина в тучных клетках тимуса мышей опытной и контрольной групп, усл. ед., $\times 10^2$

Особенностью ЛГК на границе между корковым и мозговым веществом долек тимуса является то, что именно в этих клетках на второй неделе воздействия хорионического гонадо-

тропина интенсивность люминесценции серотонина сопоставима с таковой у мышей контрольной группы.

Во всех клетках тимусной доли, люминесцирующих при обработке по методу Кросса, Эвана, Роста, изменения интенсивности люминесценции гистамина при воздействии хорионического гонадотропина прямо противоположно изменениям интенсивности люминесценции катехоламинов и серотонина.

Построенные графики показывают два перекреста интенсивности люминесценции гистамина и катехоламинов, а также два перекреста интенсивности люминесценции гистамина и серотонина в клетках, содержащих эти биоамины, которые возникают в тимусе лабораторных мышей, получавших хорионический гонадотропин в течение одного месяца. В ЛГК коркового вещества долек тимуса и в тучных клетках эта разнонаправленность более выражена.

Изменения, отражающие распределение в клетках тимуса катехоламинов и серотонина, тесно сопряжены между собой, в то время как обеспеченность клеток тимуса гистамином имеет иной характер изменений.

Под влиянием хорионического гонадотропина в тимусе мышей наблюдаются реципрокные отношения между интенсивностью люминесценции гистамина и катехоламинов, а также гистамина и серотонина во всех клетках, содержащих эти нейромедиаторные биогенные амины.

Вопросы для закрепления материала

1. Отражается ли введение физиологического раствора на взаимоотношении интенсивности люминесценции нейромедиаторных биогенных аминов в структурах тимуса?

2. Для каких клеток изменение взаимоотношения интенсивности люминесценции нейромедиаторных биогенных аминов является почти идентичным?

3. Как изменяется взаимоотношение интенсивности люминесценции нейромедиаторных биогенных аминов в содержащих их клетках тимуса?

4. Одинаково ли изменяется взаимоотношение интенсивности люминесценции нейромедиаторных биогенных аминов в содержащих их клетках и адренергических нервах?

Глава 9. ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛИМФОЦИТОВ

CD4-позитивные клетки тимуса

Иммуногистохимический метод, который выявляет CD4-позитивные клетки, идентифицирует их по неравномерно коричневому окрашиванию цитоплазмы.

Эти клетки располагаются во всех морфофункциональных зонах тимуса: в корковом и мозговом веществе долек тимуса, а также на границе коркового и мозгового вещества долек. Визуально размеры этих клеток неодинаковые. Форма CD4⁺ клеток разнообразна и варьирует от округлой до полигональной (рис. 43, 44).

В тимусе интактных мышей CD4⁺-клетки располагаются преимущественно в корковом веществе долек тимуса, их количество составляет $2,20 \pm 0,01$ клеток в поле зрения, в то время как в мозговом веществе этих клеток обнаруживается $1,20 \pm 0,01$ клеток в поле зрения. На границе коркового и мозгового вещества долек тимуса эти клетки единичны ($0,20 \pm 0,01$ шт. в поле зрения при увеличении $\times 900$) (табл. 15, 16).

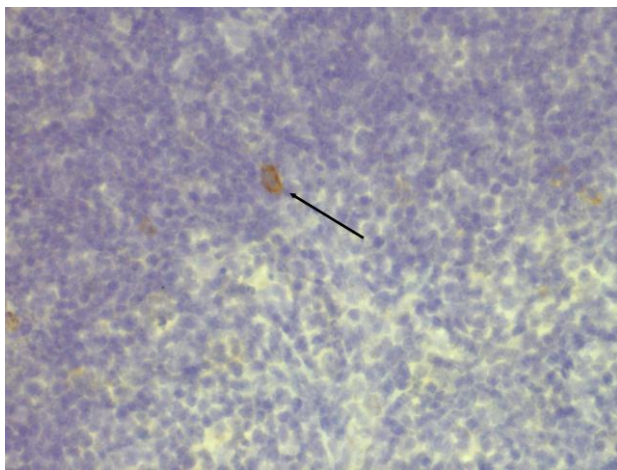


Рис. 43. Тимус мыши. Иммуногистохимический метод, выявляющий CD4⁺-клетки. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40, ок. 10

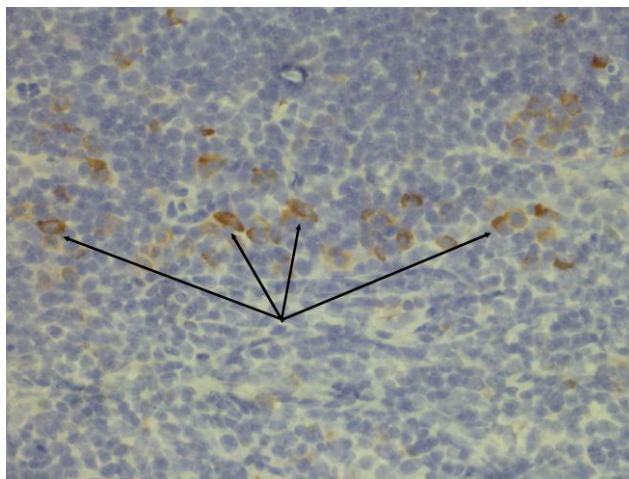


Рис. 44. Тимус мыши, получавшей хорионический гонадотропин в течение четырех недель. Иммуногистохимический метод, выявляющий CD4⁺-клетки. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40, ок. 10

Таблица 15

Количество CD4-позитивных клеток
в морфофункциональных зонах тимуса мышей
интактных и опытных групп (M±m)

Морфофункциональная зона долек тимуса	Группа животных		
	Интактные	Срок введения ХГ, нед.	
		одна	две
Корковое вещество долек	2,20±0,01	5,20±0,03*	5,10±0,05*
Мозговое вещество долек	1,20±0,01	4,60±0,10*	2,80±0,60*
Граница между корковым и мозговым веществом	0,20±0,01	0,60±0,01	0,70±0,01

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

Таблица 16

Количество CD4-позитивных клеток в морфофункциональных зонах тимуса мышей интактных и опытных групп ($M \pm m$)

Морфофункциональная зона долек тимуса	Группа животных		
	Интактные	Срок введения ХГ, нед.	
		три	четыре
Корковое вещество долек	2,20±0,01	5,60±0,50*	5,40±0,30*
Мозговое вещество долек	1,20±0,01	2,80±0,10*	9,60±0,60*
Граница между корковым и мозговым веществом	0,20±0,01	1,80±0,01*	3,00±0,20*

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

Анализ таблиц позволяет выявить тенденцию к увеличению количества CD4-позитивных клеток в поле зрения в зависимости от сроков воздействия хорионического гонадотропина. Так, количество CD4-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса опытных мышей в поле зрения возрастает более чем в два раза ($p < 0,05$), по сравнению с интактными животными, на первой неделе воздействия и остается неизменным на всем протяжении эксперимента.

На границе коркового и мозгового вещества долек тимуса количество CD4-позитивных клеток в поле зрения увеличивается пропорционально длительности введения гормона.

Поступление в организм мышей хорионического гонадотропина приводит к увеличению количества CD4⁺-клеток в корковом, мозговом и на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса на единицу площади, с достижением максимальных значений на сроке четыре недели. На границе коркового и мозгового вещества долек тимуса создаются оптимальные условия для селекции лимфоцитов и их миграции в кровотоки.

Вопросы для закрепления материала

1. Как выглядят в препаратах CD4-позитивные клетки?
2. В каких морфофункциональных зонах тимуса выявляются CD4-позитивные клетки?

3. Изменяет ли хорионический гонадотропин количество CD4-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса?

4. Изменяет ли хорионический гонадотропин количество CD4-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса?

5. Зависит ли количество CD4-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса от времени поступления хорионического гонадотропина?

6. Зависит ли количество CD4-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса от времени поступления хорионического гонадотропина?

CD8-позитивные клетки тимуса

Непрямой иммуногистохимический метод с использованием меченых пероксидазой антител позволяет выявить в клетках тимуса наличие маркера CD8 по окрашиванию содержащих его клеточных структур в коричневый цвет. Цитоплазматическая мембрана CD8⁺ клеток равномерно коричневая. Клетки, которые не экспрессируют CD8, имеют голубую окраску.

Распределение в дольках тимуса CD8⁺ клеток зависит от морфофункциональной зоны. Форма этих клеток преимущественно овально-округлая (рис. 45, 46).

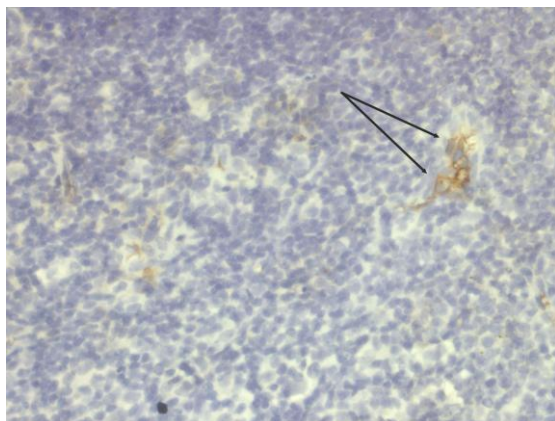


Рис. 45. Тимус мыши. Интактная группа. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD8. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 10

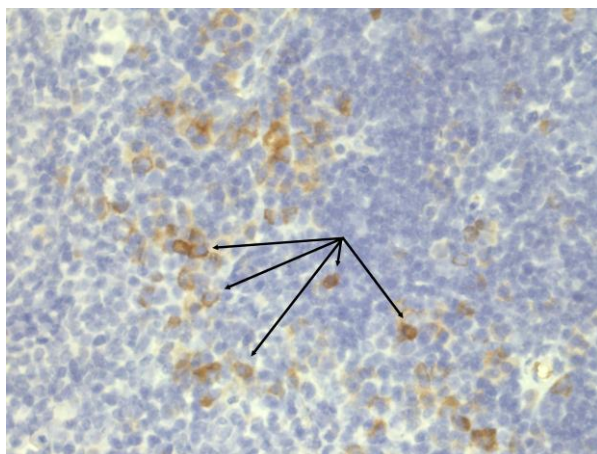


Рис. 46. Тимус мыши, получавшей хорионический гонадотропин в течение четырех недель. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD8. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 10

В корковом веществе долек тимуса интактных животных количество CD8+ клеток составляет $0,60 \pm 0,05$ в поле зрения при увеличении $\times 900$, в мозговом веществе долек и на границе коркового и мозгового вещества – $2,00 \pm 0,20$ и $1,40 \pm 0,09$ клеток в поле зрения соответственно (табл. 17, 18).

Таблица 17

Количество CD8-позитивных клеток
в морфофункциональных зонах тимуса мышей
интактных и опытных групп ($M \pm m$)

Морфофункциональная зона долек тимуса	Группа животных		
	Интактные	Срок введения ХГ, нед.	
		одна	две
Корковое вещество долек	$0,60 \pm 0,05$	$2,40 \pm 0,40^*$	$3,50 \pm 0,50^*$
Мозговое вещество долек	$2,00 \pm 0,20$	$8,80 \pm 0,90^*$	$7,90 \pm 0,60^*$
Граница между корковым и мозговым веществом	$1,40 \pm 0,09$	$0,60 \pm 0,05$	$2,80 \pm 0,20$

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

Таблица 18

Количество CD8-позитивных клеток
в морфофункциональных зонах тимуса мышей
интактных и опытных групп ($M \pm m$)

Морфофункциональная зона долек тимуса	Группа животных		
	Интактные	Срок введения ХГ, нед.	
		три	четыре
Корковое вещество долек	0,60±0,05	5,20±0,60*	8,00±0,40*
Мозговое вещество долек	2,00±0,20	6,00±0,30*	7,60±0,03*
Граница между корковым и мозговым веществом	1,40±0,09	3,60±0,50*	3,40±0,05*

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

Данные таблицы позволяют сделать вывод, что введение хорионического гонадотропина значительно увеличивает количество CD8-позитивных клеток в корковом и мозговом веществе долек тимуса независимо от срока воздействия.

В корковом веществе долек тимуса мышей и на границе коркового и мозгового вещества долек количество CD8⁺ клеток в поле зрения увеличивается прямо пропорционально сроку воздействия гормона. В мозговом веществе количество изучаемых клеток значительно возрастает после одной недели поступления гормона, в дальнейшем снижается, оставаясь при этом повышенным в сравнении с интактной группой.

Поступление хорионического гонадотропина в организм мышей на всех сроках введения оказывает влияние на количество CD8⁺ клеток в корковом, мозговом и на границе коркового и мозгового вещества тимусной дольки. Наиболее выраженные изменения количества этих клеток наблюдаются после четырех недель введения хорионического гонадотропина для всех морфофункциональных зон долек тимуса.

Вопросы для закрепления материала

1. Как выглядят в препаратах CD8-позитивные клетки?
2. В каких морфофункциональных зонах вывеляются CD8-позитивные клетки?
3. Изменяет ли хорионический гонадотропин количество CD8-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса?

4. Изменяет ли хорионический гонадотропин количество CD8-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса?

5. Зависит ли количество CD8-позитивных клеток в корковом веществе и в мозговом веществе долек тимуса от времени поступления хорионического гонадотропина?

6. Соотнесите изменения, связанные с CD4- и CD8-позитивными клетками, при поступлении хорионического гонадотропина в течение одной недели. Одинаковы ли они?

7. Соотнесите изменения, связанные с CD4- и CD8-позитивными клетками, при поступлении хорионического гонадотропина в течение двух недель. Одинаковы ли они?

8. Соотнесите изменения, связанные с CD4- и CD8-позитивными клетками, при поступлении хорионического гонадотропина в течение трех недель. Одинаковы ли они?

Пролиферативные процессы в тимусе

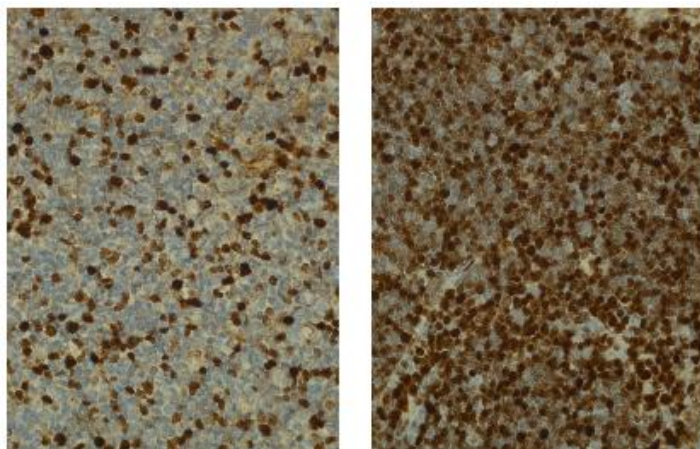
Для оценки клеточной пролиферации используются антитела к маркеру Ki-67 – ядерному антигену, экспрессируемому в пролиферативной фазе клеточного цикла. Ядра клеток, содержащих Ki-67, окрашиваются в коричневый цвет разной степени интенсивности. Морфологически клетки, содержащие Ki-67, характеризуются с разной степенью окраски ядер.

В корковом веществе долек тимуса мышей, независимо от экспериментальной группы, содержится большое количество клеток, экспрессирующих белок Ki-67 (рис. 47).

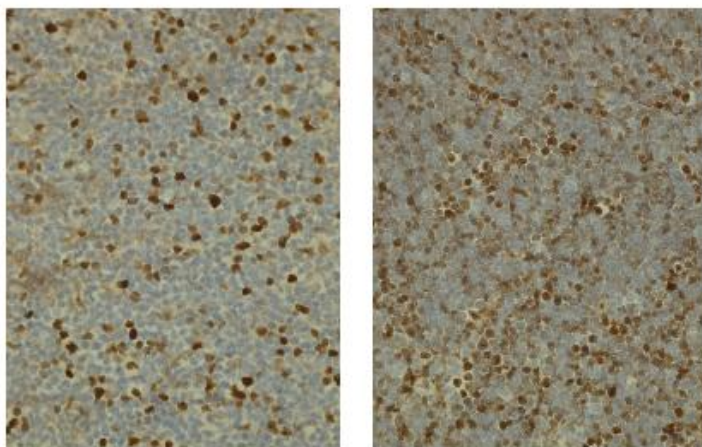
Иммуногистохимическая реакция с антителами к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 неодинакова для коркового и мозгового вещества долек тимуса интактных и получавших хорионический гонадотропин мышей (табл. 19, 20).

Через одну неделю после введения хорионического гонадотропина у мышей опытной группы, по сравнению с интактной группой, число пролиферирующих клеток в корковом веществе увеличивается в 1,3 раза ($p < 0,001$), в мозговом веществе – в 1,4 раза ($p < 0,05$). После двух недель введения хорионического гонадотропина экспрессия Ki-67 в мозговом веществе долек тимуса мышей обеих групп сопоставима, а в корковом веществе под воздействием гормона происходит ее уменьшение.

В последующие две недели введения хорионического гонадотропина количество экспрессирующих Ki-67 клеток заметно снижается в обеих структурно-функциональных зонах, причем в большей степени это снижение выражено в корковом веществе долек тимуса.



a



б

Рис. 47. Тимус мыши. Иммуногистохимическая реакция, выявляющая маркер Ki-67 в мозговом (слева) и корковом (справа) веществе долек тимуса: *a* – интактная мышь; *б* – мышь, получавшая хорионический гонадотропин в течение четырех недель. Микроскоп Leica DM4000B. Увеличение×400

Таблица 19

Экспрессия Ki-67 в корковом веществе долек тимуса
экспериментальных мышей, %

Срок, нед.	Группа мышей	
	Интактные	Получавшие ХГ
Одна	53,0±1,7	70,4±2,5**
Две	54,2±2,4	40,8±2,0*
Три	51,3±2,0	33,5±1,8*
Четыре	56,1±2,7	27,3±1,9*

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

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

Таблица 20

Экспрессия Ki-67 в мозговом веществе долек тимуса
экспериментальных мышей, %

Срок, нед.	Группа мышей	
	Интактные	Получавшие ХГ
Одна	25,8±0,8	36,2±2,3*
Две	24,4±1,2	23,4±1,8
Три	26,6±1,3	19,9±1,3*
Четыре	28,9±1,5	16,9±1,9**

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

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

Введение хорионического гонадотропина обуславливает снижение пролиферативной активности клеток как в корковом, так и в мозговом веществе долек тимуса.

Поступление хорионического гонадотропина в течение двух, трех и четырех недель приводит к снижению экспрессии белка Ki-67 клетками мозгового и коркового вещества долек тимуса мышей, что влияет на процессы дифференцировки Т-лимфоцитов.

Вопросы для закрепления материала

1. С какой целью применяются антитела к маркеру Ki-67?
2. Как выглядят в препаратах Ki-67-позитивные клетки?

3. В каких морфофункциональных зонах выявляются Ki-67-позитивные клетки?

4. Как высчитывается экспрессия Ki-67 в препаратах?

5. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на количестве Ki-67-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса?

6. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на количестве Ki-67-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса?

7. Зависит ли количество Ki-67-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса от времени поступления хорионического гонадотропина?

8. Зависит ли количество Ki-67-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса от времени поступления хорионического гонадотропина?

Процессы апоптоза в тимусе

Иммуногистохимическая реакция с использованием антител к белку-супрессору апоптоза bcl-2 позволяет выявить в дольках тимуса клетки, экспрессирующие этот белок. Антиапоптотический белок bcl-2 локализуется на мембранах, и экспрессия этого белка возрастает при высокой интенсивности клеточного деления. Клетки, экспрессирующие белок bcl-2, овальной формы, располагаются скоплениями в корковом веществе долек тимуса. Цитоплазматическая их мембрана и цитоплазма окрашиваются в коричневый цвет с разной степенью интенсивности (рис. 48).

У интактных животных мышей в тимусе имеются различия в экспрессии белка bcl-2, в различных морфофункциональных зонах в корковом веществе обнаруживается $6,2 \pm 1,3$ клетки в поле зрения (при увеличении $\times 400$).

При этом в мозговом веществе долек тимуса они не выявляются. Введение хорионического гонадотропина в течение одной недели увеличивает количество этих клеток до $7,3 \pm 0,6$ штук в поле зрения.

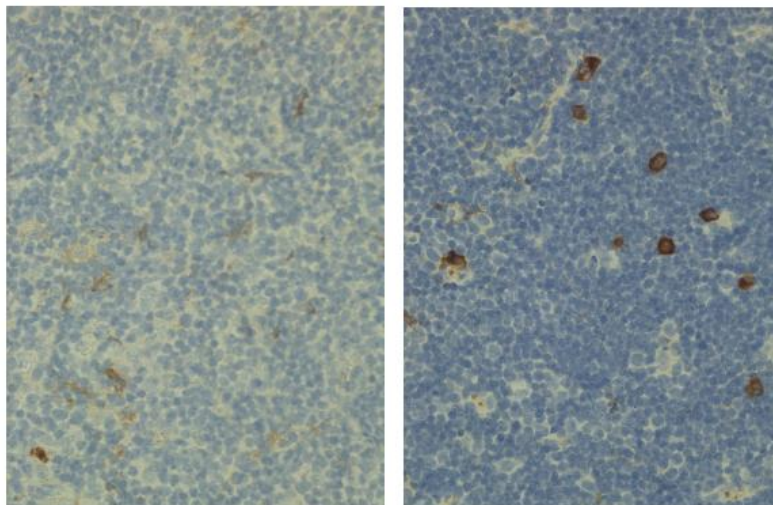


Рис. 48. Тимус мышей, получавших хорионический гонадотропин в течение четырех недель. Bcl-2-позитивные клетки в мозговом (слева) и корковом (справа) веществе долек тимуса. Микроскоп Leica DM4000B. Увеличение $\times 400$

На двухнедельном сроке введения хорионического гонадотропина число этих клеток составляет $9,1 \pm 0,5$ штук в поле зрения. Впоследствии количество клеток, экспрессирующих белок bcl-2, уменьшается и составляет $6,1 \pm 0,4$ и $6,2 \pm 0,3$ клеток в поле зрения для сроков введения хорионического гонадотропина три и четыре недели соответственно. В мозговом веществе долек тимуса выявляются единичные bcl-2-позитивные клетки при введении хорионического гонадотропина в течение трех недель.

Введение хорионического гонадотропина стимулирует экспрессию белка-супрессора апоптоза bcl-2 как в корковом, так и мозговом веществе долек тимуса мышей.

Вопросы для закрепления материала

1. С какой целью применяются антитела к маркеру bcl-2?
2. Как выглядят в препаратах bcl-2-позитивные клетки?

3. В каких морфофункциональных зонах выявляются bcl-2-позитивные клетки?

4. Отражается ли введение хорионического гонадотропина на количестве bcl-2-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса?

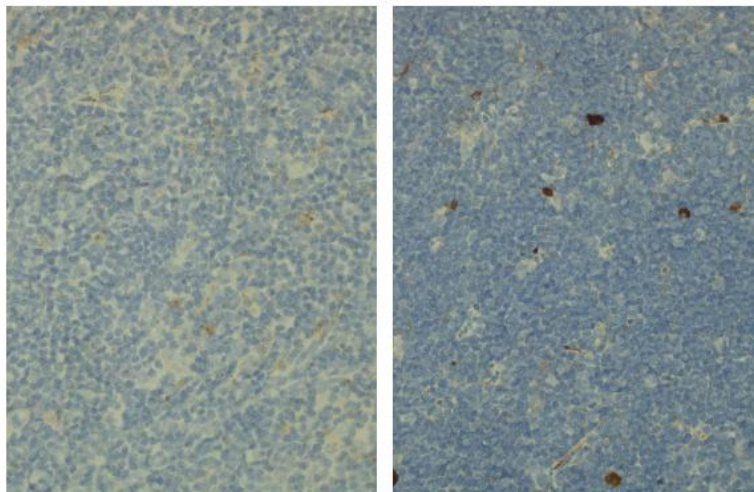
Распределение белка p-53 в тимусе

Ядерный белок p-53 осуществляет контроль состояния ДНК, появление этого белка указывает на запуск апоптоза. Иммуногистохимическая реакция с использованием антител к маркеру апоптоза, белку p-53, выявляет клетки с коричневой окраской цитоплазмы и цитоплазматической мембраны разной степени интенсивности. Экспрессия белка апоптоза p-53 имеет различия в корковом и мозговом веществе долек тимуса (рис. 49). Количество клеток, экспрессирующих белок p-53, неодинаково в тимусе экспериментальных мышей (табл. 21).

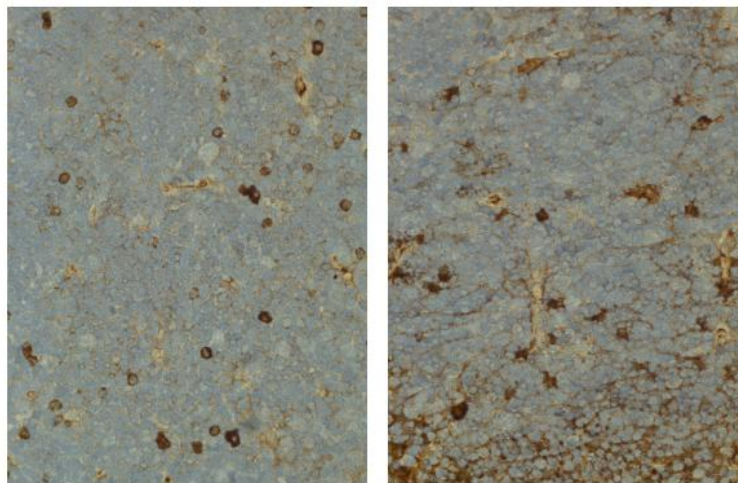
В корковом веществе тимуса у интактных животных количество клеток, экспрессирующих белок p-53, составляет $3,8 \pm 0,3$ штук в поле зрения (при увеличении $\times 400$). Через одну неделю после введения хорионического гонадотропина количество p-53-позитивных клеток незначительно снижается до $3,6 \pm 0,5$ штук в поле зрения. Через две недели количество клеток, экспрессирующих белок p-53, резко увеличивается до $12,0 \pm 0,9$ клеток в поле зрения. Эта тенденция сохраняется через три и четыре недели поступления хорионического гонадотропина ($18,2 \pm 0,8$ и $25,2 \pm 1,3$ штук в поле зрения соответственно).

Экспрессии белка p-53 в клетках мозгового вещества долек тимуса у интактных животных при поступлении хорионического гонадотропина в течение одной недели не наблюдается.

Через две недели после введения гормона в мозговом веществе долек тимуса появляются p-53 позитивные клетки – $6,7 \pm 0,4$ штук в поле зрения, и характер изменения количества клеток в корковом и мозговом веществе долек тимуса приобретает разнонаправленный характер.



a



б

Рис. 49. Позитивная реакция к p-53 в клетках мозгового (слева) и коркового (справа) вещества долек тимуса мыши: *a* – интактная мышь; *б* – мышь, получавшая хорионический гонадотропин в течение трех недель. Иммуногистохимическая реакция, выявляющая белок p-53. Микроскоп Leica DM4000B. Увеличение $\times 400$

Таблица 21

Количество клеток, экспрессирующих белок p-53,
в поле зрения в морфофункциональных зонах
долек тимуса мышей

Срок, нед.	Количество клеток, экспрессирующих белок p-53, ед. в п. зр.			
	Корковое вещество долек тимуса		Мозговое вещество долек тимуса	
	Интактные	Получавшие ХГ	Интактные	Получавшие ХГ
Одна	4,0±0,5	3,6±0,5	0	0
Две	3,0±0,3	12,0±0,9*	0	6,7±0,4
Три	4,0±0,6	18,2±0,8*	0	3,6±0,3
Четыре	4,0±0,4	25,2±1,3**	0	2,5±0,2

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

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

Имеет место прямая зависимость между сроком введения хорионического гонадотропина и количеством клеток, экспрессирующих белок p-53 в корковом веществе долек тимуса мышей.

Вопросы для закрепления материала

1. С какой целью применяются антитела к белку p-53?
2. Как выглядят в препаратах p-53-позитивные клетки?
3. В каких морфофункциональных зонах тимуса выявляются p-53-позитивные клетки?
4. Отражается ли введение гормона на процессах апоптоза в морфофункциональных зонах тимуса?

Глава 10. ОБОБЩЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА ТИМУС

При введении человеческого хорионического гонадотропина лабораторным мышам действие его на тимус проявляется комплексом изменений, включающим микроморфологические, люминесцентно-гистохимические и иммуногистохимические особенности тимуса.

Микроморфологические изменения заключаются в следующем: происходит абсолютное и относительное увеличение средней площади мозгового вещества долек тимуса в течение первых трех недель поступления хорионического гонадотропина. Кроме того, поступление этого гормона отражается на количественных и качественных характеристиках тучных клеток: с увеличением времени воздействия в поле зрения возрастает количество тучных клеток, что сопровождается увеличением степени их метахромазии и дегрануляции.

Люминесцентно-гистохимические изменения заключаются в появлении второго ряда люминесцирующих клеток на границе между корковым и мозговым веществом долек тимуса, с одной стороны, и изменением интенсивности люминесценции биогенных аминов (катехоловых аминов, серотонина, гистамина) в содержащих их структурах – с другой.

Наблюдается преимущественное снижение интенсивности люминесценции катехоламинов в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества, ЛГК коркового вещества, лимфоцитах коркового и мозгового вещества и тучных клетках тимуса мышей на введение хорионического гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель; в адренергических нервных волокнах интенсивность люминесценции катехоламинов снижается, исключение составляет срок две недели, на котором интенсивность люминесценции нейроаминов незначительно повышается.

Введение хорионического гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель приводит к преимущественному снижению интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества, ЛГК коркового вещества, лимфоцитах коркового вещества, тучных клетках и адренергических нервах тимуса, однако в лимфоцитах мозгового

вещества долек тимуса интенсивность люминесценции серотонина повышается при введении гормона в течение двух недель.

Изменения, отражающие распределение в клетках тимуса катехоламинов и серотонина, тесно сопряжены между собой, в то время как обеспеченность клеток тимуса гистамином имеет иной характер изменений.

Колебание интенсивности люминесценции гистамина во всех содержащих его клетках тимуса сходно, оно имеет волнообразный характер. Введение хорионического гонадотропина приводит к повышению интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса, в ЛГК коркового вещества, в лимфоцитах коркового и мозгового вещества и в тучных клетках, причем пики повышения количественного содержания диамина обнаружены на первой и третьей неделях введения гормона.

Под влиянием хорионического гонадотропина в тимусе мышей наблюдаются реципрокные отношения между интенсивностью люминесценции гистамина и катехоламинов, а также гистамина и серотонина во всех клетках, содержащих гистамин, катехоламины и серотонин. Таким образом, имеет место перераспределение гистамина, с одной стороны, и катехоламинов и серотонина – с другой, в ЛГК коркового вещества, ЛГК на границе коркового и мозгового вещества, лимфоцитов коркового и мозгового вещества долек тимуса, а также в тучных клетках.

Вероятно, такой тип перераспределения биогенных аминов внутри клеток, а не между ними, связан с изменением экспрессии рецепторов к биогенным аминам на их поверхности.

Современная концепция нейроиммуоэндокринных связей в тимусе заключается в том, что изменение содержания нейромедиаторов в микроокружении иммунокомпетентных клеток воспринимается рецепторами этих клеток, что обеспечивает изменение метаболизма и функциональной активности и в иммуннокомпетентной клетке, и в самом тимусе. На лимфоцитах имеются рецепторы к норадреналину, адреналину, дофамину, ацетилхолину, что позволяет лимфоидным органам быстро и разнообразно реагировать на любые воздействия.

В зависимости от сроков внутримышечного введения хорионического гонадотропина в тимусе изменяется количество

CD4⁺ и CD8⁺ клеток. На границе коркового и мозгового вещества долек тимуса количество CD4-позитивных клеток в поле зрения увеличивается пропорционально длительности введения гормона. В корковом веществе долек тимуса мышей и на границе коркового и мозгового вещества долек количество CD8⁺ клеток в поле зрения увеличивается прямо пропорционально сроку воздействия гормона, а в мозговом веществе количество изучаемых клеток значительно возрастает после одной недели поступления гормона, в дальнейшем снижается, оставаясь при этом повышенным в сравнении с интактной группой.

Введение хорионического гонадотропина обуславливает снижение пролиферативной активности клеток как в корковом, так и в мозговом веществе долек тимуса, о чем свидетельствует уменьшение количества клеток, содержащих белок Ki-67. Поступление хорионического гонадотропина в течение двух, трех и четырех недель приводит к нарастающему снижению экспрессии белка Ki-67 клетками мозгового и коркового вещества долек тимуса мышей, что влияет на процессы дифференцировки лимфоцитов в тимусе.

Равновесие между процессами пролиферации, дифференцировки и апоптоза является ключевым в нормальном функционировании клеток. Поступление хорионического гонадотропина приводит к увеличению экспрессии белка p-53 – маркера апоптоза в клетках коркового вещества долек тимуса прямо пропорционально сроку воздействия хорионического гонадотропина.

Кроме того, введение хорионического гонадотропина стимулирует экспрессию белка-супрессора апоптоза bcl-2 как в корковом, так и мозговом веществе долек тимуса мышей.

При введении хорионического гонадотропина в течение одной, двух, трех, четырех недель запускаются процессы дифференцировки Т-лимфоцитов при непосредственном участии тучных клеток и адренергических нервов, обеспечивающих дольку тимуса нейромедиаторными биогенными аминами. Кроме того, усиливается экспрессия белков апоптоза p-53 в клетках коркового вещества долек тимуса.

ИТОГОВЫЕ ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Процесс созревания Т-лимфоцитов занимает примерно:

- а) 10 суток;
- б) 20 суток;
- в) 30 суток;
- г) 60 суток.

2. В корковом веществе долек тимуса преобладают Т-лимфоциты:

- а) созревающие;
- б) делящиеся;
- в) молодые;
- г) созревшие.

3. В тимусе происходит:

- а) положительная селекция МНС-специфичных клеток;
- б) отрицательная селекция аутоспецифических клеток;
- в) положительная селекция аутоспецифических клеток;
- г) индукция апоптоза.

4. Популяция $CD4^+$ Т-лимфоцитов включает:

- а) Т-киллеры;
- б) Т-хелперы;
- в) Т-индукторы;
- г) Т-супрессоры.

5. CD8-позитивная субпопуляция Т-лимфоцитов состоит из цитотоксических клеток, выполняющих функцию:

- а) регуляторную;
- б) хелперную;
- в) киллерную;
- г) эффекторную.

6. Важную роль во взаимодействии кровеносных и лимфатических сосудов в тимусе играют:

- а) люминесцирующие гранулосодержащие клетки долек;
- б) лимфоциты коркового вещества долек;

- в) тучные клетки;
- г) лимфоциты мозгового вещества долек.

7. Холинергические нервные волокна тимуса отходят от нерва:

- а) блуждающего;
- б) шейного;
- в) возвратного;
- г) диафрагмального.

8. Норадренергические нервные волокна тимуса расположены:

- а) в корковом веществе;
- б) в периваскулярной зоне;
- в) в мозговом веществе;
- г) в наружной субкапсулярной зоне.

9. Метод окраски метиленовым синим по Шабдашу применяется для выявления:

- а) тучных клеток;
- б) нервных элементов;
- в) кровеносных сосудов;
- г) лимфоцитов.

10. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларна применяется для выявления в структурах тимуса:

- а) гистамина;
- б) серотонина;
- в) гепарина;
- г) катехоламинов.

11. Двусторонняя взаимосвязь между нервной и иммунной системами обеспечивает:

- а) адаптацию организма к внешним условиям;
- б) адекватную реакцию организма на раздражения;
- в) активацию внутриклеточных сигнальных систем;
- г) нормальный гомеостаз.

12. Биогенные амины играют роль:

- а) местных гормонов;
- б) общих гомеостатиков;
- в) иммуномодуляторов;
- г) нейромедиаторов.

13. Катехоламины синтезируются:

- а) в передней форме гипофиза;
- б) цитоплазме нервных клеток;
- в) мозговом веществе надпочечников;
- г) цитоплазме железистых клеток.

14. Последовательность синтеза катехоламинов:

- а) 3-,4- диоксифенилаланин → тирозин → адреналин → норадреналин;
- б) адреналин → норадреналин → тирозин → 3-,4- диоксифенилаланин;
- в) тирозин → 3-,4- диоксифенилаланин → адреналин → норадреналин;
- г) тирозин → 3-,4- диоксифенилаланин → норадреналин → адреналин.

15. Катехоламины могут выполнять функции:

- а) ферментов;
- б) гормонов;
- в) иммуномодуляторов;
- г) нейромедиаторов.

16. Под влиянием катехоламинов:

- а) усиливается фагоцитарная активность макрофагов;
- б) увеличивается количество Т-лимфоцитов в крови;
- в) не изменяется количество и состояние тучных клеток;
- г) регулируется лимфопоз.

17. Серотонин может синтезироваться:

- а) в мышечных клетках;
- б) клетках желудочно-кишечного тракта;
- в) клетках костного мозга;
- г) клетках центральной нервной системы.

18. *Рецепторы к серотонину:*

- а) Т-рецепторы;
- б) D-рецепторы;
- в) В-рецепторы;
- г) М-рецепторы.

19. *Фермент моноаминоксидаза, обеспечивающий инактивацию большей части серотонина, локализуется:*

- а) на мембране аппарата Гольджи;
- б) мембране лизосом;
- в) внутренней мембране митохондрий;
- г) внешней мембране митохондрий.

20. *Взаимоотношение серотонина с катехоламинами:*

- а) однонаправленное;
- б) синергическое;
- в) конкурентное;
- г) экспрессивное.

21. *Серотонин проникает в ядро клетки и:*

- а) депрессирует строго определенные участки РНК;
- б) активирует строго определенные участки РНК;
- в) депрессирует строго определенные участки ДНК;
- г) активирует строго определенные участки ДНК.

22. *Серотонин свое иммунодепрессивное действие реализует через систему:*

- а) эпифиз – гипофиз – надпочечники;
- б) гипоталамус – гипофиз – надпочечники;
- в) гипофиз – эпифиз – надпочечники;
- г) надпочечники – гипоталамус – гипофиз.

23. *Дофаминзависимая стимуляция иммунологических процессов осуществляется через:*

- а) тимус;
- б) гипофиз;
- в) эпифиз;
- г) надпочечники.

24. Угнетение иммуногенеза серотонином осуществляется через следующий орган:

- а) гипоталамус;
- б) гипофиз;
- в) надпочечники;
- г) эпителиамус.

25. Серотонин не регулирует пролиферативную активность:

- а) эндотелиальных клеток;
- б) эпителиальных клеток;
- в) нервных клеток;
- г) лимфоцитов.

26. Серотонин можно выявить:

- а) суданом черным «В»;
- б) люминесцентно-гистохимическим методом Фалька-Хилларпа;
- в) методом Массона-Фонтана;
- г) люминесцентно-гистохимическим методом Кросса.

27. Гистамин в организме не:

- а) снижает фагоцитарную активность;
- б) усиливает фагоцитарную активность;
- в) усиливает бласттрансформацию;
- г) активизирует выделения фагоцитами лизосомальных ферментов.

28. Гистамин влияет на иммунный ответ через рецепторы:

- а) H_1 ;
- б) H_2 ;
- в) H_3 ;
- г) H_4 .

29. Для выявления гистамина в тимусе применяют:

- а) метод Фалька-Хилларпа;
- б) окраску по Унна;
- в) окраску по Романовскому-Гимза;
- г) метод Кросса, Эвана, Роста.

30. Тучные клетки влияют на ангиогенез с помощью факторов:

- а) ИЛ-1;
- б) ИЛ-3;
- в) ИЛ-6;
- г) ИЛ-8.

31. В тимусе клеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия обуславливают клетки:

- а) вырабатывающие нейромедиаторы;
- б) экспрессирующие нейромедиаторы;
- в) экспрессирующие нейромедиаторы и нейропептиды;
- г) вырабатывающие и экспрессирующие нейромедиаторы и нейропептиды.

32. Комплексный препарат «Тактивин» был получен:

- а) из тимуса;
- б) щитовидной железы;
- в) паращитовидной железы;
- г) половых желез.

33. Индивидуальный иммуноактивный компонент препаратов тимуса – тимоген является:

- а) полипептидом;
- б) трипептидом;
- в) дипептидом;
- г) веществом не пептидной природы.

34. Модулирование функции иммунной системы в тимусе осуществляется через:

- а) нейротрансмиттеры;
- б) нейропептиды;
- в) гормоны;
- г) нейротрансмиттеры, нейрогормоны и гормоны.

35. Альфа-субъединица хорионического гонадотропина человека состоит:

- а) из 12 аминокислот, связанных водородными связями;
- б) 114 аминокислот, связанных ковалентными связями;

- в) 92 аминокислот, связанных дисульфидными связями;
- г) 145 аминокислот, связанных пептидными связями.

36. В составе хорионического гонадотропина углеводы составляют около:

- а) 10%;
- б) 20%;
- в) 30%;
- г) 40%.

37. Хорионический гонадотропин по своей химической природе является:

- а) гликопротеином;
- б) липопротеином;
- в) гликолипопротеином;
- г) гликолипидом.

38. Хорионический гонадотропин состоит:

- а) из альфа-субъединицы;
- б) бета-субъединицы;
- в) альфа- и бета-субъединиц;
- г) альфа-, бета- и гамма-субъединиц.

39. Роль хорионического гонадотропина в эмбриогенезе:

- а) стимуляция размножения клеток;
- б) рост клеток;
- в) дифференцировка клеток;
- г) все вышеперечисленное.

40. Одним из методов диагностики беременности является определение в крови:

- а) лютеинизирующего гормона;
- б) хорионического гонадотропина;
- в) фолликулостимулирующего гормона;
- г) пролактина.

41. Разовая лечебная доза хорионического гонадотропина в медицинской практике равна:

- а) 300 ЕД;
- б) 400 ЕД;

- в) 500 ЕД;
- г) 600 ЕД.

42. После оплодотворения выработка хорионического гонадотропина начинается в течение:

- а) получаса;
- б) часа;
- в) двух часов;
- г) трех часов.

43. Хорионический гонадотропин:

- а) снижает активность Т-киллеров в крови;
- б) повышает активность Т-киллеров в крови;
- в) усиливает приток Т-киллеров в матку;
- г) снижает приток Т-киллеров в матку.

44. Большие дозы хорионического гонадотропина в тимусе:

- а) снижают активность биоаминосодержащих клеток;
- б) увеличивают активность биоаминосодержащих клеток;
- в) угнетают пролиферативную активность лимфоцитов;
- г) повышают пролиферативную активность лимфоцитов.

45. Выберите неверный ответ. При беременности наблюдается:

- а) уменьшение экспрессии маркеров CD16/CD56 натуральными киллерами;
- б) супрессия Т-киллеров;
- в) снижение активности Т-киллеров в крови;
- г) усиление притока Т-киллеров в матку.

46. Лабораторные грызуны являются адекватной моделью для постановки опытов по изучению функционирования тимуса из-за того, что у грызунов:

- а) распределение дендритных клеток в тимусе грызунов сходно с распределением дендритных клеток в тимусе детей;
- б) селекция Т-лимфоцитов протекает с той же интенсивностью, что и у человека;

- в) в тимусе грызунов выделяют те же морфологические зоны, что и в тимусе человека;
- г) распределение тимусных телец у грызунов сходно с таковым у человека.

47. Для общей гистологической характеристики структур тимуса используется метод:

- а) окраски полихромным толуидиновым синим по Унна;
- б) окраски гематоксилином и эозином;
- в) люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа;
- г) окраски суданом черным «В».

48. Введение хорионического гонадотропина в течение месяца приводит в тимусе:

- а) к уменьшению площади мозгового вещества;
- б) уменьшению площади коркового вещества;
- в) увеличению площади мозгового вещества;
- г) увеличению площади коркового вещества.

49. Тучные клетки тимуса на введение хорионического гонадотропина реагируют:

- а) увеличением общего количества;
- б) уменьшением общего количества;
- в) увеличением степени метахромазии и дегрануляции;
- г) уменьшением степени метахромазии и дегрануляции.

50. ЛГК коркового вещества долек тимуса мышей на введение хорионического гонадотропина реагируют:

- а) увеличением концентрации катехоламинов;
- б) снижением концентрации катехоламинов;
- в) интенсивность люминесценции катехоламинов в ЛГК уменьшается;
- г) интенсивности люминесценции катехоламинов в ЛГК увеличивается.

51. Введение хорионического гонадотропина лабораторным мышам приводит в тимусе:

- а) к снижению интенсивности люминесценции серотонина в адренергических нервах;

- б) повышению интенсивности люминесценции серотонина в тучных клетках;
- в) снижению интенсивности люминесценции серотонина в ЛГК коркового вещества долек;
- г) повышению интенсивности люминесценции серотонина ЛГК на границе коркового и мозгового вещества долек.

52. В тучных клетках тимуса при введении хорионического гонадотропина интенсивность люминесценции гистамина:

- а) снижается;
- б) повышается;
- в) не меняется;
- г) меняется волнообразно.

53. Степень изменения интенсивности люминесценции катехоламинов, серотонина и гистамина в биоаминосодержащих клетках тимуса зависит:

- а) от разовой дозы вводимого физраствора;
- б) сроков введения физиологического раствора;
- в) способа введения хорионического гонадотропина;
- г) сроков введения хорионического гонадотропина.

54. Под влиянием хорионического гонадотропина в тимусе отношения между интенсивностью люминесценции гистамином и интенсивностью люминесценции катехоламинов являются:

- а) высокими;
- б) низкими;
- в) реципрокными;
- г) стабильными.

55. В дольках тимуса интактных мышей CD4-позитивные клетки преобладают:

- а) в корковом веществе;
- б) мозговом веществе;
- в) на границе коркового и мозгового вещества;
- г) в корковом и мозговом веществе.

56. Количество CD4-позитивных клеток во всех зонах долек тимуса максимальных значений достигает при введении хорионического гонадотропина в течение:

- а) одной недели;
- б) двух недель;
- в) трех недель;
- г) четырех недель.

57. Непрямой иммуногистохимический метод с использованием меченных пероксидазой антител позволяет выявить в тимусе клетки:

- а) CD3;
- б) CD4;
- в) CD8;
- г) CD68.

58. Независимо от сроков введения хорионического гонадотропина количество CD8-позитивных клеток в тимусе значительно увеличивается:

- а) в корковом веществе долек;
- б) мозговом веществе долек;
- в) корковом и мозговом веществе долек;
- г) на границе коркового и мозгового вещества долек.

59. Антитела к маркеру Ki-67 используются:

- а) для выявления меченых пероксидазой антител;
- б) выявления антител к белку-супрессору апоптоза;
- в) выявления субпопуляций Т-лимфоцитов;
- г) оценки клеточной пролиферации.

60. Антиапоптотический белок bcl-2 локализуется:

- а) в цитоплазме клеток;
- б) на мембранах;
- в) в пузырьках аппарата Гольджи;
- г) в эндоплазматической сети.

Ключи к итоговым тестовым заданиям

1) б;	31) г;
2) б;	32) а;
3) а, б, г;	33) в;
4) б, в;	34) г;
5) а, в, г;	35) в;
6) в;	36) в
7) а, в, г;	37) а;
8) а, в;	38) в;
9) б;	39) г;
10) б, г;	40) б;
11) а, б, в, г;	41) в;
12) а, в, г;	42) б;
13) б, в;	43) а, в;
14) г;	44) б, в;
15) б, в, г;	45) а;
16) а, б, г;	46) а, в, г;
17) б, в, г;	47) б;
18) а, б, г;	48) в;
19) г;	49) а, в;
20) в;	50) б, в;
21) в;	51) а, в;
22) б;	52) б, г;
23) а;	53) г;
24) в;	54) в;
25) в;	55) а;
26) б, в;	56) г;
27) а;	57) а, б, в, г;
28) а, б, в, г;	58) в;
29) г;	59) г;
30) а, в, г;	60) б.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение хорионического гонадотропина белым лабораторным мышам в очередной раз позволяет убедиться в том, что в живом организме существует связь между нервной и иммунной системами, в поддержании которой участвуют нейромедиаторные биогенные амины. Изменения, сопровождающиеся перераспределением нейромедиаторных биогенных аминов между клетками, а также между клетками и их микроокружением, являются свидетельством вовлечения нейроиммуноэндокринной системы в регуляторные процессы жизнедеятельности организма.

Иммуномодулирующий эффект хорионического гонадотропина на структуры тимуса мышей подчеркивает роль нейроиммуноэндокринной системы в процессах адаптации организма к внешним и внутренним изменениям.

Без изучения механизмов регуляции в нейроиммуноэндокринной системе невозможно грамотное этиопатогенетическое применение гормонов в лечении ряда заболеваний.

На практических занятиях по смежным дисциплинам, медицинской биологии, гистологии, общей иммунологии, в образовательных учреждениях высшего профессионального медицинского образования следует обращать внимание на роль нейроиммуноэндокринной системы в процессах адаптации организма к внешним и внутренним изменениям, чтобы получить многомерное представление о происходящих процессах.

Данные о том, что введение хорионического гонадотропина в лечебной дозе мышам-самкам вовлекает в изменения структурно-функционального статуса тимуса биогенные нейроамины (катехоламины, серотонин, гистамин), могут быть особенно полезны будущим гинекологам и эндокринологам.

Со всеми вопросами, а также замечаниями и предложениями, возникшими после прочтения данного учебного пособия, можно обратиться по адресу: crataegi@rambler.ru

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

1. Эндокринная регуляция. Биохимические и физиологические аспекты: учеб. пособие / А.Н. Смирнов ; под ред. В.А. Ткачука. 2009. 368 с.
2. Гистология, цитология и эмбриология: учебник для мед. вузов / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. 600 с.
3. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
4. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов / под ред. чл.-корр. РАМН В.В. Банина и проф. В.Л. Быкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.

Дополнительный

1. Артишевский А.А. Гистология с техникой гистологических исследований / А.А. Артишевский, А.С. Леонтьев, Б.А. Слука. – Мн: Вышэйш. шк., 1999. 236 с.
2. Гордон Д.С. Тучные клетки в эксперименте: метод. указания // Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 1982. 29 с.
3. Гордон Д.С. Нейромедиаторы лимфоидных органов / Д.С. Гордон, В.Е. Сергеева, И.Г. Зеленова. Л.: Наука, 1982. 128 с.
4. Дьячкова И.М. Некоторые адаптационные реакции тимуса на поступление кальция и кремния с питьевой водой / И.М. Дьячкова, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева, С.П. Сапожников. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2014. 140 с.
5. Клиническая фармакология тимогена / ред. В.С. Смирнов. СПб.: 2003. 106 с.
6. Сарилова И.Л. Основы нейроэндокринологии тимуса: конспект лекций / И.Л. Сарилова, В.Е. Сергеева; Чуваш. ун-т. Чебоксары, 2010. 20 с.
7. Сергеева В.Е. Люминесцентно-гистохимическая характеристика ранней реакции моноаминсодержащих структур тимуса на антигенные воздействия / В.Е. Сергеева, Д.С. Гордон. Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 1992. 352 с.

Источники, из которых взяты фотографии, схемы и таблицы

1. Гистология, цитология и эмбриология: учебник. Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский и др.; под ред. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юриной. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002. 744 с.

2. Гордон Д.С. Нейромедиаторы лимфоидных органов (функциональная морфология) / Д.С. Гордон, В.Е. Сергеева, И.Г. Зеленова. Л.: Наука, 1982. 128 с.
3. Сидоров А.В. Физиология межклеточной коммуникации : учеб. пособие / А. В. Сидоров. Мн.: БГУ, 2008. 215 с.
4. Синельников Р.Д. Атлас анатомии человека // Р.Д. Синельников, Я.Р. Синельников. М.: Медицина, 1996. Т. 2. 264 с.
5. Цинкернагель Р. Основы иммунологии / Р. Цинкернагель. М.: Мир, 2008. 35 с.
6. Цырлина Е.В. Хорионический гонадотропин как маркер трофобластической болезни / Е.В. Цырлина, Т.Е. Порошина // Практическая онкология. 2008. Т. 9, № 3. С. 150–160.
7. Ярилин А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. М.: Медицина, 1999. 608 с.
8. Bulfone-Paus S. and Bahri R. (2015) Mast cells as regulators of T cell responses. *Front. Immunol.* 6:394. doi: 10.3389/fimmu.2015.00394
9. Dvorak A.M. Ultrastructural Studies of Human Basophils and Mast Cells // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* Volume 53(9): 1043–1070, 2005.
10. Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. Histamine in the Nervous System. *Physiol Rev* 88: 1183–1241, 2008.
11. Kin N.W. It takes nerve to tell T and B cells what to do / W.N. Kin, V.M. Sanders // *Journal of Leukocyte Biology*. 2006. Vol. 79. P. 1093–1104.
12. Mingfu L., Xiaotong D., Xiaojing S. et al. Study on the Dynamic Compound Structure Composed of Mast Cells, Blood Vessels, and Nerves in Rat Acupoint / L.Mingfu, D. Xiaotong, S. Xiaojing et al. // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2013, Article ID 160651, 4 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/160651>
13. Tayarani I. C., Changeux J.-P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective // *J. Leukoc. Biol.* 81: 599–606; 2007.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Введение	6
Глава 1. Общая характеристика нейроэндокринной регуляции	8
Эндокринные железы и их гормоны.....	11
Понятие о нейроиммунноэндокринной системе.....	11
Глава 2. Тимус	13
Топография тимуса. Развитие тимуса у человека.....	13
Строение тимусной долики. Развитие лимфоцитов в тимусе.....	15
Значение апоптоза в развитии лимфоцитов.....	23
Кровоснабжение тимуса. Гематотимический барьер.....	28
Глава 3. Нервные компоненты тимуса	32
Иннервация тимуса. Способы выявления нервных волокон.....	32
Взаимодействие нервной и иммунной систем.....	42
Катехоловые амины (строение, метаболизм, способы выявления).....	44
Серотонин (строение, метаболизм, способы выявления).....	47
Гистамин (строение, метаболизм, способы выявления).....	52
Глава 4. Тучные клетки тимуса	58
Морфология тучных клеток.....	58
Методы изучения тучных клеток.....	61
Глава 5. Эндокринные компоненты тимуса	72
Понятие о дисперсной эндокринной системе.....	72
Сигнальные молекулы тимического происхождения.....	74
Глава 6. Хорионический гонадотропин	78
Строение и функции хорионического гонадотропина.....	78
Хорионический гонадотропин в медицинской практике.....	80
Иммуномодулирующая роль хорионического гонадотропина.....	82
Моделирование влияния хорионического гонадотропина на тимус.....	84
Глава 7. Влияние хорионического гонадотропина на морфологию тимуса	89
Морфологические изменения тимусной долики.....	89
Характеристика тучных клеток тимуса.....	92
Глава 8. Влияние хорионического гонадотропина на структуры тимуса	99
Влияние хорионического гонадотропина на структуры тимуса, содержащие катехоловые амины.....	99
Влияние хорионического гонадотропина на структуры тимуса, содержащие серотонин.....	99
Влияние хорионического гонадотропина на структуры клетки тимуса, содержащие гистамин.....	112
Взаимоотношение интенсивности люминесценции нейромедиаторных биогенных аминов в тимусе.....	118
Глава 9. Влияние хорионического гонадотропина на процессы пролиферации и дифференцировки лимфоцитов	123
CD4-позитивные клетки тимуса.....	123

CD8-позитивные клетки тимуса.....	126
Пролиферативные процессы в тимусе.....	130
Процессы апоптоза в тимусе.....	133
Распределение белка р-53 в тимусе.....	135
Глава 10. Обобщение действия хорионического гонадотропина на тимус.....	138
Итоговые тестовые задачи.....	141
Ключи к итоговым тестовым задачам.....	153
Заключение.....	154
Список рекомендуемой литературы.....	155
Источники, из которых взяты фотографии, схемы и таблицы.....	156

Учебно-теоретическое издание

Ялалетдинова Лейсан Рамиловна
Гордова Валентина Сергеевна
Ястребова Светлана Александровна
Сергеева Валентина Ефремовна

**НЕЙРОИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА**

Учебное пособие

Редактор *Г.В. Плотникова*
Компьютерная вёрстка и правка *Е.В. Ивановой*

Согласно закону № 436 – ФЗ от 29 декабря 2010 года
данная продукция не подлежит маркировке

Подписано в печать 10.06.16. Формат 60×84/16.
Бумага газетная. Печать офсетная. Гарнитура Times.
Усл. печ. л..... Уч.-изд. л..... Тираж 250 экз. №...

Издательство Чувашского университета
Типография университета
428015 Чебоксары, Московский просп., 15



Ялалетдинова Лейсан Рамиловна – кандидат медицинских наук, практикующий врач акушер-гинеколог. Область профессиональных интересов: репродуктивное здоровье женщин.



Гордова Валентина Сергеевна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова».



Ястребова Светлана Александровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова».



Сергеева Валентина Ефремовна – доктор биологических наук, профессор, заслуженный работник высшей школы Российской Федерации, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». Под её руководством защищено пятнадцать кандидатских и две докторские диссертации по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.