

Министерство образования Российской Федерации  
Федеральное государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
“Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова”

**Научно-исследовательская работа  
на конкурс научных работ молодых исследователей  
“Молодежь в научном сообществе”**

Тема:

**Комплексные исследования биоаминосодержащих структур  
тимуса и селезёнки при введении Т-активина**

Исполнители: студент первого курса лечебного факультета  
Лепешкин А.П., студент первого курса стоматологического  
факультета Никонов Б.В.

Научный руководитель: Ястребова С.А.

Чебоксары 2003

В настоящее время многие реакции иммунитета не достаточно изучены. Поэтому эта проблема обратила на себя наше пристальное внимание. Нами были исследованы тимус и селезенка. Тимус является центральным органом кроветворения и иммунитета, а селезенка – периферическим.

Давно установлена связь между обратным развитием тимуса и снижением защитных сил организма, направленных против возбудителей инфекционных болезней и злокачественных новообразований. Например, тимэктомия у новорожденных животных вызывает резкое угнетение пролиферации лимфоцитов во всех лимфоидных фолликулах кроветворных органов, исчезновение малых лимфоцитов из крови, резкое уменьшение количества лейкоцитов и другие характерные симптомы (атрофия органов, кровоизлияния). При этом организм оказывается весьма чувствительным ко многим инфекционным заболеваниям и не отторгает чужеродные трансплантаты органов.

Тимус играет важнейшую роль в функционировании клеточного и гуморального иммунитета. В нем происходит развитие клеток-предшественников из костного мозга в Т-лимфоциты, а также секреция гормонов, влияющих на развитие и созревание определенных клеток лимфоидной ткани.

Селезенка – важный кроветворный и защитный орган, принимающий участие как в элиминации отживающих, поврежденных эритроцитов, тромбоцитов, так и в организации защитных реакций от экзогенных антигенов, которые не были задержаны лимфатическими узлами и проникли в кровотоки. Селезенка активно принимает участие в образовании гуморального и клеточного иммунитета.

Тимус и селезенка, являясь органами иммунитета, находятся в тесном взаимодействии друг с другом. Т-лимфоциты мозгового вещества тимуса с током крови попадают в периферические органы иммунитета, в том числе и в

селезенку. В ней совершается антигензависимая специализация, связанная с разделением их на субпопуляции: хелперы, супрессоры, киллеры.

Из экстрактов вилочковой железы выделяют ряд гормонов, представленных в основном полипептидами (тимозин, тимопэтин 1 и 2, тимусный гуморальный фактор и другие) и получен ряд экстрактивных препаратов (Тималин, Тимопэтин, вилозен, Т-активин), предложенных для применения в качестве иммуностимулирующих средств. Они содержат перечисленные гормоны и в значительной мере близки между собой по действию.

Мы исследовали биоаминосодержащие структуры тимуса и селезёнки при ведение Т-активина – препарата полипептидной природы, полученного из вилочковой железы крупного рогатого скота. Применяется он в комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся преимущественным поражением Т-системы иммунитета: злокачественных новообразованиях, аутоиммунных заболеваниях. В то же время Т-активин применяется при лечении больных рецидивирующей розей с сопутствующей экземой [8], при лечении больных псориазом [4], туберкулезом легких [3], для иммунорегуляции при рецидивирующем ортофталмогерпесе [5,6], у больных рассеянным склерозом [2], в комплексном лечении больных раком яичников [1] и в дерматологии [7]. Между тем, учеными было замечено, что изменения концентрации биогенных аминов являются достоверным показателем функционального состояния тимуса и селезёнки при ведении различных препаратов. Поэтому для нас было важно определить, как влияет на биоаминный статус структур тимуса и селезёнки воздействие Т-активином.

При люминесцентно-микроскопическом визуальном исследовании и при проведении микроспектрального анализа учеными было выяснено, что на территории коркового вещества дольки тимуса люминесцирующие клетки располагаются двумя рядами:

1 ряд – премедулярный, состоящий из крупных компактно расположенных полигональных клеток с гранулами беловато-желтого или беловато-зеленого свечения;

2 ряд – субкапсулярный, состоящий из мелких клеток с гранулами белого, желтого и зеленого оттенков.

Спектрофлуориметрически в обоих видах клеток обнаружены серотонин, гистамин и катехоламины (Сергеева В.Е., 1970, 1986). Данные клетки были идентифицированы как макрофаги.

Микроспектрофлуориметрически в экспериментах с введением вегетотропных препаратов (адреномиметрических, адреноблокирующих, серотонина, гистамина, гистаминсвязывающих веществ) доказано наличие серотонина, гистамина, катехоламинов в премедулярных клетках. Премедулярные клетки причастны к синтезу серотонина, гистамина, а также к связыванию катехоламинов; в них определяется простагландин  $E_2$  (Гордон Д.С., 1990). Эти клетки позитивны на моноаминоксидазу (МАО) и только некоторые – на кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу. Они обладают суданофилией и аргентаффиномностью. В этой же зоне тимуса определены альдегид-фуксин-положительные клетки, клетки со окрытой метахромазией (Сергеева В.Е., Гордон Д.С., Гунин А.Г., 1994; Петрова Т.Л. с соавт., 1996, 1998, 1999) и найдены меланопродуцирующие клетки (Кветной И.М., 1981; Кветной и др., 1982, 1987). Субкапсулярные клетки во многом сходны с премедулярными, но отличаются отсутствием признаков, свидетельствующих о синтезе в них биогенных аминов.

В тимусе в норме постоянно присутствуют тканевые базофилы, или тучные клетки. Они выделяют медиаторы (гистамин, серотонин, катехоламины и др.), регулируя просвет и проницаемость сосудов и облегчая рециркуляцию и миграцию образовавшихся тимоцитов (Burnet, 1971), а также содержат гепарин, участвующий в инактивации биоаминов. Тучные клетки являются огромным по ёмкости депо гистамина, серотонина и катехоламинов (Bigaj et al., 1991).

При изучении селезенки люминесцентно-гистохимическим способом в ней выявляются следующие люминесцирующие тканевые структуры: макрофаги и клеточная масса красной пульпы, внутрифолликулярные и береговые люминесцирующие клетки белой пульпы, нервные волокна, ветвящиеся тяжистые структуры типа лимфатических сосудов внутри лимфоидных фолликулов и тучные клетки (Зеленова И.Г., 1971). В селезенке происходит продукция иммуноглобулинов, в том числе обсонизирующих антител, необходимых для быстрого и эффективного удаления бактерий из кровотока. При спленектомии наблюдается снижение уровня сывороточных антител. Селезенка служит местом образования гуморальных факторов, влияющих на систему мононуклеарных фагоцитов. Примером служит тафтеин, тетрапептит, стимулирующий активность фагоцитов. Предполагается, что в селезенке при помощи гидролитических ферментов происходит отщепление этого тетрапептида от молекулы Ig Q. У индивидуумов, не имеющих селезенки, отмечено снижение в крови уровня тафтеина, отсюда и снижение резистентности к инфекциям (Чельшев Ю.А., 1995).

Здесь необходимо отметить особую роль биоаминов в формировании иммунного ответа. Гистамин – биогенный амин, образующийся из аминокислоты гистидина при каталитическом участии фермента гистидиндекарбоксилазы (Чернух А.М., 1979). Он является одним из важнейших биологически активных веществ, регулирующих жизненные функции организма. Гистамин активно воздействует на дифференцировку лимфоцитов, которая связана с наличием у них рецепторов к этому амину (Khan et al., 1986; Hellstrand et al., 1986). Гистамин способствует розеткообразованию, увеличивает число эозинофилов моноцитов и нейтрофилов, усиливает регуляторную активность макрофагов и рост фибробластов за счет усиления синтеза белка, участвует в заживлении ран, повышает сопротивляемость организма к инфекции, усиливает воспалительный процесс (Поляк Н.Р., 1983; Голстян Т.В., 1986). Уровень гистамина в крови у бестимусных мышей, а также и воспалительная реакция

понижены (Paulson, 1988). С другой стороны, при моделировании клеточных иммунных реакций *in vitro* гистамин ингибирует Т-лимфоциты (Brostoff, 1980).

На основе физиологических и иммунофизиологических исследований доказано, что не только гистамин, но и серотонин и катехоламины оказывают существенное влияние на интенсивность иммунных реакций: розеткообразование, антителообразование, цитотоксичность, миграции и взаимодействие лимфоцитов (Денисенко П.П., Чередниченко Р.П., 1977; Балмасова И.П. и др., 1983; Божко Г.Х., 1984).

Серотонин – это биоамин, который относится к классу индоламинов и синтезируется из аминокислоты триптофана клетками организма: энтерохромаффинными (в них вырабатывается до 90% всего эндогенного серотонина), клетками эпифиза, лимфоидных органов, костного мозга, тучными клетками и базофилами крови.

Серотонин оказывает влияние на функциональную активность тимуса, вызывая в малых дозах пролиферацию мозгового вещества тимусных долек, увеличивая число слоистых эпителиальных телец Гассалья (Юсин В.А. и др., 1972), угнетая первичный иммунный ответ. Серотонин вместе с гистамином высвобождается при реакции антиген-антитело и участвует в реакции гиперчувствительности немедленного типа (Елисеева Л.С., 1970; Елисеева Л.С., Стефанович Л.Е., Панова В.С., 1982). Установлено, что серотонин подавляет обратный захват норадреналина нервными окончаниями и тромбоцитами, является либератором гистамина (Qielst, 1971). Девойно Л.В., Альперина Е.Л. в 1982 году установили, что серотонин, увеличивая число Т-супрессоров, подавляет иммунный ответ.

Катехоламины – это биоамины, синтезирующиеся в клетках мозгового вещества надпочечников и нервной системы (Malmfors, 1965) из аминокислоты тирозина через образование 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОВА). Инактивация катехоламинов происходит несколькими путями: окислительным дезаминированием при помощи МАО, метилированием при помощи катехоламин-О-метилтрансферазы (КОМТ), хиноидным окислением,

ацетилированием и другими. Мощный механизм инактивации катехоламинов – обратный нейрональный захват, причем нервное волокно по всему протяжению может накапливать экзогенный норадреналин. Катехоламины усиливают фагоцитарную активность макрофагов и увеличивают число Т-хелперов.

В своей работе мы провели анализ динамики нейромедиаторных биогенных аминов – гистамина, катехоламинов, серотонина – в структурах тимуса и селезенки люминесцентно-гистохимическими методами.

**Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М.** Он основан на реакции конденсации катехоламинов формальдегидом с образованием 1,2,3,4 - тетрагидроизохинолинов, которые в результате дегидрирования превращаются в 3,4 - дигидроизохинолины. Кето-таутомеры продуктов реакции образуют люминесцирующий комплекс веществ, дающий изумрудно-зеленую флуоресценцию при облучении видимым сине-фиолетовым светом 3,4 - дигидро- $\beta$ -карболин, который в подобных реакциях образуются из серотонина. Он дает желтое свечение.

**Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста** Метод определения гистамина в тканях основан на реакции паров ортофталевого альдегида с гистамином, в ходе которой образуются флуоресцирующие производные имидозалилетиламина. При исследовании срезов под люминесцентным микроскопом образовавшийся комплексный продукт дает при большой концентрации лимонно-желтое, при среднем – зеленое, при малом – голубое свечение.

**Метод спектрофлуориметрии.** На люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-4 была установлена дополнительная насадка ФМЭЛ-1А. Для определения серотонина использовался светофильтр с длиной волны 525 нм, для катехоламинов – с длиной волны 480 нм и для гистамина – фильтр с длиной волны 515 нм. Показания снимались с табло усилителя в условных единицах (у.е.).

В том числе мы провели анализ тучных клеток тимуса и селезенки по степени метахромазии и дегрануляции при воздействии Т-активином. Для



ЭТОГО МЫ ИСПОЛЬЗОВАЛИ *метод окраски срезов полихромным толудиновым синим по Унна*. При окраске по данному методу тучные клетки классифицируются по двум критериям, с помощью которых они подразделяются на следующие виды (Porpers et al., 1949):

Посостоянию мукополисахаридов:

а)  $\alpha$ -ортохромные виды с голубой окраской цитоплазмы и несульфатированным

б)  $\beta_1$ -метахроматичные тучные клетки с фиолетовым окрашиванием гранул в цитоплазме и с более сульфатированным, незрелым гепарином;

в)  $\beta_2$ -метахроматичные тучные клетки, имеющие фиолетовую цитоплазму с красноватым оттенком за счет созревания сульфатированного гепарина;

г)  $\beta_3$ -метахроматичные тучные клетки с красно-фиолетовой цитоплазмой и почти зрелым гепарином;

д)  $\gamma$ -метахроматичные тучные клетки с пурпурной окраской и с полностью сульфатированным, зрелым гепарином в гранулах.

По степени дегрануляции, согласно классификации Д.П.Линднер (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.

Нами была изучена динамика концентрации гистамина, катехоламинов и серотонина в премедуллярных и субкапсулярных макрофагах, лимфоцитах коркового и мозгового вещества и тканевых базофилах тимуса; в внутрифолликулярных макрофагах, береговых клетках и макрофагах красной пульпы селезенки; тучные клетки селезенки и тимуса по степени



метахромазии и дегрануляции методом Унна через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 суток после введения Т-активина.

Объектом нашего исследования служила вилочковая железа и селезенка 60 белых беспородных крыс-самцов массой 150-200 г. Тимус и селезенка животных забирались под глубоким эфирным наркозом через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 суток после воздействия Т-активином. Животные были разделены на 2 группы: 1 – контрольные животные (30), которым вводили физиологический раствор в бедренную мышцу; 2 – подопытные животные (30), которым вводили Т-активин в дозе 1 мкг/кг.

Из ткани тимуса и селезенки готовились криостатные срезы, которые обрабатывались несколькими методами.

**1. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларна в модификации Е.М. Крохиной** применялся для выявления катехоламинов и серотонина.

**2. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвена, Роста** применялся для выявления гистаминсодержащих структур тимуса и селезенки.

Полученные препараты рассматривались нами под люминесцентным микроскопом ЛЮМАМ-4 с длиной волны возбуждающего света 360 нм

**3. Метод спектрофлуориметрии** использовался для идентификации и количественного выражения уровней гистамина, серотонина и катехоламинов в тканевых структурах тимуса и селезенки.

**4. Метод окраски срезов полихромным толуидиновым синим по Унна.** Он применялся для контроля состояния тканевых мукополисахаридов и гепарина в тучных клетках исследуемых органов.

Представление о количественном распределении тучных клеток в тимусе и селезенке дает подсчет их в десяти полях зрения микроскопа (пять в септе и пять в паренхиме). Последующими вычислениями находились среднеарифметические значения для каждого случая.

**5. Метод статистической обработки материала.** Статистическая обработка полученных значений проводилась с помощью программы

## G-STAT.

Как показали наши исследования, при введении Т-активина концентрация серотонина во всех исследуемых структурах тимуса после введения препарата плавно снижается на седьмые сутки и вновь повышается на тридцатый день.

Уровень гистамина в различные сроки введения Т-активина мало изменяется в премедуллярных, субкапсулярных макрофагах и тучных клетках, в то время как в тимоцитах коркового и мозгового веществ резко повышается к концу месяца.

Катехоламины в ответ на введение Т-активина изменяют свою концентрацию в мозговых и корковых тимоцитах в сторону увеличения, а в премедуллярных, субкапсулярных макрофагах, а также в тучных клетках – волнообразно, снижаясь на седьмые сутки и вновь повышаясь на тридцатый день.

Введение Т-активина также способствует увеличению в тимусе числа  $\beta_2$ - и  $\beta_3$ -метахроматичных тучных клеток по степени созревания гепарина, и Т1-, Т2-форм - по степени дегрануляции (табл.1,2).

При проведении исследований нами было отмечено, что в селезенке при введении Т-активина концентрации катехоламинов в В-зависимой зоне снижаются при всех сроках воздействия, кроме введенных тридцать суток назад, а показатель гистамина повышается.

В внутрифолликулярных макрофагах прослеживается однонаправленная динамика концентрации серотонина и гистамина. Их уровни повышаются на 1, 3, 7 сутки и снижаются на 14, 21, 30 сутки воздействия Т-активина.

В макрофагах красной пульпы и в береговых клетках на всех сроках воздействия концентрация серотонина снижена.

При воздействии Т-активином в селезенке практически 100% популяции тучных клеток занимают Т<sub>2</sub>-формы (табл.3). На 1, 3 и 14 сутки воздействия в контрольной группе животных половину популяции тучных клеток составляют Т<sub>2</sub>-формы по степени дегрануляции, остальная часть клеток относится к Т<sub>1</sub>- и Т<sub>3</sub>-формам (табл.4). Введение Т-активина способствует

резкому увеличению числа  $\beta_3$ - и  $\alpha$ - метахроматичных тучных клеток на седьмой день воздействия (табл.3). В то время как в контрольной группе животных на всех сроках практически все тучные клетки имеют  $\beta_2$ - и, в меньшей степени,  $\beta_1$ -метахромазию (табл.4).

**Таблица 1. Изменения состояний мукополисахаридов, гепарина и форм тучных клеток тимуса при введении Т-активина.**

	T <sub>0</sub> *	T <sub>1</sub> *	T <sub>2</sub> *	T <sub>3</sub> *	$\alpha$ *	$\beta_1$ *	$\beta_2$ *	$\beta_3$ *	$\gamma$ *
1 сутки	-	47	18	4	-	-	69	-	-
3 сутки	18	41	30	4	-	-	93	-	-
7 сутки	6	7	13	8	-	-	34	-	-
14 сутки	-	6	31	6	-	-	43	-	-
21 сутки	3	28	39	11	-	-	42	39	-
30 сутки	-	74	76	-	-	-	150	-	-

\* где T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>-формы тучных клеток;

$\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ - состояния тканевых мукополисахаридов и гепарина.

**Таблица 2. Изменения состояний мукополисахаридов, гепарина и форм тучных клеток тимуса при введении физраствора.**

7 сутки	-	7	38	19	-	-	64	-	-
14 сутки	3	28	17	4	-	-	52	-	-
21 сутки	22	43	34	80	=	=	59	=	=
30 сутки	1	46	65	24	=	=	107	=	=

**Таблица 3. Изменения состояний мукополисахаридов, гепарина и форм тучных клеток селезенки при введении Т-активина.**

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	α	β <sub>1</sub>	β <sub>2</sub>	β <sub>3</sub>	γ
1 сутки	-	-	1	3	-	-	4	-	-
3 суток	-	-	2	-	-	-	2	-	-
7 суток	-	-	9	-	2	-	4	3	-
14 суток	-	-	4	-	-	-	4	-	-
21 сутки	-	-	6	1	-	1	6	-	-
30 суток	-	1	-	-	-	-	1	-	-

**Таблица 4. Изменения состояний мукополисахаридов, гепарина и форм тучных клеток селезенки при введении физраствора.**

30 сутки	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	α	β <sub>1</sub>	β <sub>2</sub>	β <sub>3</sub>	γ
1 сутки	-	2	5	4	-	-	11	-	-
3 сутки	-	1	5	2	-	-	7	1	-
7 сутки	-	-	6	-	-	-	6	-	-
14 сутки	-	3	5	1	-	2	7	-	-
21 сутки	-	-	3	-	-	-	3	-	-

### *Список литературы*

1. Грязнова И.М., Макаров О.В. и др. Тактивин в комплексном лечении больных раком яичников // *Акушерство и гинекология*. 1988. №8. С. 57 - 61.
2. Гусев Е.И., Арион В.Я. и др. Опыт применения Т-Активина у больных рассеянным склерозом // *Журнал невропатологии и психиатрии*. 1984. №2. С. 168.
3. Иванова Л.А., Павлова Н.Б. Терапия Т-активином в комплексном лечении больных туберкулезом легких // *Проблемы туберкулеза*. 1986. №5.

С. 37 - 42.

4. Коротский И.Г., Ружицкая Е.А. и др. Опыт применения Т-активина у больных псориазом // Вестник дерматологии. 1985. №7. С. 47 - 51.

5. Мальпаков В.Б., Гринаев И.А. и др. Применение тактивина и тималина при лечении офтальмогерпеса // Вестник офтальмологии. 1991. №5. С. 51 - 54.

6. Микули С.Г., Казаченко М.А. Применение Т-активина для иммунорегуляции при рецидивирующем офтальмогерпесе // Вестник офтальмологии. 1985. №5. С. 44 - 48.

7. Скрипкин Ю.К., Короткий Н.Г. и др. Перспективы применения иммунокорригирующего лечения фактором тимуса (тактивином) в дерматологии // Вестник дерматологии. 1986. №4. С. 4 - 7.

8. Фролов В.М., Пересадин Н.А. и др. Т-активин в лечении больных рецидивирующей розей с сопутствующей экземой // Вестник дерматологии. 1989. №9. С. 47 - 51.