

УДК 616-092.9:599.323.4:577.118

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА SP-ПОЗИТИВНЫХ СТРУКТУР ТИМУСА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КАЛЬЦИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

Дьячкова И.М., Сергеева В.Е.

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, e-mail: iraida-djachkova@rambler.ru

Проведено исследование длительного поступления кальция с питьевой водой на структуры тимуса лабораторных крыс. С помощью иммуногистохимических и статистических методов исследованы SP-позитивные структуры тимуса 80 лабораторных крыс. Морфологические изменения тимуса свидетельствуют об избирательном характере действия солей кальция на SP-позитивные структуры. Выявлено, что длительное поступление кальция с питьевой водой (235 мг/л в течение 60 дней) приводит к увеличению количества SP-позитивных клеток в корковом веществе и на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса, к уменьшению размера и площади исследуемых клеток в корковом веществе долек. Анализ полученных данных показал, что поступление в организм лабораторных крыс с питьевой водой соединения кальция повышает экспрессию SP-рецепторов клетками тимуса. Наши результаты исследования показали адаптационные изменения структур долек тимуса на поступление соли кальция и усиление пролиферации и дифференцировки тимоцитов. Выявленные морфологические изменения SP-позитивных клеток отражают проявление адаптационных реакций тимуса на действие солей кальция.

Ключевые слова: тимус, кальций, SP-позитивные клетки

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF SP-POSITIVE STRUCTURES OF THE THYMUS OF LABORATORY RATS IN THE PREPARATION OF CALCIUM WITH DRINKING WATER

Dyachkova I.M., Sergeeva V.E.

Chuvash State University n.a. I.N. Ulyanov, Cheboksary, e-mail: iraida-djachkova@rambler.ru

A long-term intake of calcium with drinking water into the structure of the thymus of laboratory rats was studied. With the help of immunohistochemical and statistical methods, SP-positive structures of the thymus were studied in 80 laboratory rats. Morphological changes in the thymus testify to the selective nature of the action of calcium salts on SP-positive structures. It was found that prolonged intake of calcium with drinking water (235 mg / L for 60 days) leads to an increase in the number of SP-positive cells in the cortex and on the border of the cortical and medulla of the thymus lobules, to a decrease in the size and area of the cells in the cortex Lobules. An analysis of the data obtained showed that the intake of calcium compounds in laboratory rats with drinking water increases the expression of SP receptors by thymus cells. Our research results showed adaptive changes in the structure of the thymus lobes to calcium salt intake and increased proliferation and differentiation of thymocytes. Identified morphological changes SP-positive cells reflect the manifestation of the adaptation reactions of the thymus to the action of calcium salts.

Keywords: thymus, calcium, SP-positive cells

Известно, что ионизированный кальций играет важную роль в жизнедеятельности организма. Кальций посредством кальций-зависимого белка кальмодулина регулирует разнообразные биологические процессы: секрецию инсулина, тиреоидных гормонов, гормонов надпочечников, кишечной секреции, лизосомных ферментов [3], участвует в высвобождении нейромедиаторов, клеточной пролиферации [7, 2], в синтезе простагландинов, распаде микротрубочек, лейкоцитарном фагоцитозе. Он занимает важнейшее место в функционировании центральных и периферических нейронов [3].

Ионы кальция также необходимы для нормального функционирования лимфоидной ткани. Выявлено, что гипокальциемия угнетает митотическую активность лимфоидной ткани, а гиперкальциемия, наоборот,

стимулирует эту митотическую активность. В норме после нескольких циклов пролиферации лимфоцитов обычно происходит их дифференцировка, которая в целом рассматривается как процесс альтернативной пролиферации [4].

В тимусе выявлены и описаны нервные волокна, содержащие нейропептиды: вазоактивный интестинальный пептид, родственный кальцитонину [6], нейропептид Y, субстанция P [9, 11]. В кортикомедуллярной зоне выявлены ВИП-содержащие и нейропептид SP-позитивные клетки [1]. В соединительной ткани капсулы и септ тимуса были идентифицированы SP-содержащие нервные волокна [8], которые находились в тесном контакте с тучными клетками [10]. Известны функциональные рецепторы SP на поверхности лимфоцитов, макрофагов,

тучных клеток [9]. Макрофаги различных видов животных и человека имеют рецепторы для субстанции P, которые секретируют ИЛ-1, -6, ФНО α и ПГЕ 2 [5].

В организме наблюдается взаимодействие эндокринной, нервной и иммунной систем. Примером такого взаимодействия нервной и иммунной систем служит влияние нейропептида – субстанции P – на функцию макрофагов. Субстанция P содержит 11 аминокислотных остатков, относится к семейству биоактивных пептидов или тахикининам и встречается повсеместно в центральной и периферической нервной системе [5].

Субстанция P обладает весьма широким спектром биологической активности. Оказывает сосудорасширяющее действие, влияет на артериальное давление крови, способствует деградации тучных клеток, активирует синтез и высвобождение медиаторов воспаления, увеличивает капиллярную проницаемость, является хемотактантом для лейкоцитов, вызывает сокращение гладкой мускулатуры, оказывает секретогенное действие, стимулирует высвобождение пролактина [1].

В современной литературе нет данных о SP-позитивных структурах тимуса лабораторных крыс при поступлении в организм хлорида кальция с питьевой водой. Необходимо морфологическая оценка нейропептидсодержащих клеток тимуса, для оценки адаптации тимуса на длительное введение кальция с питьевой водой.

Цель исследования – изучение морфологических и количественных изменений SP-позитивных структур тимуса лабораторных крыс при поступлении в организм хлорида кальция с питьевой водой.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явился тимус 80 белых нелинейных беспородных лабораторных крыс-самцов одного возраста и одинаковой массы (150–200 г), содержащихся в обычных условиях при естественном освещении и сбалансированном рационе питания.

Все действия, предусматривавшие контакты с экспериментальными животными, осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.13.1986 г.

Животные были разделены на 2 группы: первая группа – интактные (контрольные) – 40 особей, которые получали питьевую воду соответствующую требованиям ГОСТ Р 51309-99, ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4. 1116-02; вторая, или опытная, состояла из 40 особей животных, которые употребляли питьевую воду соответствующую требованиям ГОСТ Р 51309-99, ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4. 1116-02 с добавлением кальция 235 мг/л (вода+CaCl $_2$).

В среднем в течение суток опытные животные получали с питьевой водой 8,1–10,2 мг/кг кальция. Эксперимент длился два месяца. Выведение животных из эксперимента проводилось путем декапитации с соблюдением требований гуманности согласно правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных «О порядке проведения эвтаназии животного» (Приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Криостатные срезы тимуса толщиной 10 мкм обрабатывались непрямым иммуногистохимическим методом. Блок неспецифического связывания проводился преинкубацией срезов с 10% козьей сывороткой и 0,05% тритоном X-100. В качестве первичных антител были использованы кроличьи поликлональные антитела против рецепторов вещества P (rabbit polyclonal anti-Substance P receptor, 1:5000, Affinity BioReagents, Inc, USA), вторичных антител – меченные биотинилом кроличьи антитела (1:1000, goat anti-rabbit Ig G, Vector Laboratories). Для визуализации позитивного окрашивания срезы инкубировались с авидин-биотинным комплексом (Vector Laboratories) и диамино-бензоидином. Последний дает коричневую окраску детектированным SP-позитивным структурам.

Морфометрический анализ включал определение размеров клеточных структур тимуса микроскопом МИКМЕД-5 (при увеличении объектива 40 и окуляра 10), находящихся в десяти полях зрения размером 0,04 мм 2 . Расчет площадей клеток производился с использованием программы «Sigma Scan Pro 5.0». О количественном распределении клеток судили по подсчету их в 10 полях зрения.

Статистический анализ полученных цифровых данных проводился с помощью программы Microsoft Office Excel с оценкой достоверности различия средних величин по t-критерию Стьюдента. Вычислялись: M – среднеарифметическая величина, σ – стандартная ошибка среднего значения, p – достоверность различия показателей подопытных групп по сравнению с контрольной группой: * – p \leq 0,05; ** – p \leq 0,01.

Результаты исследования и их обсуждение

У интактных животных с помощью иммуногистохимической реакции в долях тимуса выявляются SP-позитивные структуры. SP-позитивные клетки темно-коричневой окраски четко определяются на светло-коричневом фоне лимфоидной ткани железы во всех морфофункциональных зонах. Размеры и количество SP-позитивных клеток тимуса лабораторных животных в морфо-функциональных зонах различны (рис. 1).

В субкапсулярной зоне долек железы выявляются крупные SP-позитивные клетки, по размерам и морфологическим признакам соответствуют тучным клеткам тимуса [2] (рис. 2). D. Lorton et al., 1990 г. [9] впервые выявлены SP-рецепторы на поверхности лимфоцитов, макрофагов, тучных клеток.

Длительный прием соли кальция с водой приводит к увеличению количества SP-позитивных клеток в 1,4 раза в корковом ве-

ществе (в контроле – 57, в опыте – 80 клеток в десяти полях зрения) в 1,1 раза на границе коркового и мозгового вещества (в контроле – 66, в опыте – 73 клеток в десяти полях зрения) и уменьшению в 1,1 раза – в мозговом веществе долек тимуса (в контроле – 65, в опыте – 56 клеток в десяти полях зрения).

Производились измерения двух диаметров всех SP-позитивных клеток, находящихся в десяти полях зрения размером 0,04 мм². Затем методом сигмальных отклонений рассчитывались объем и площадь клеток, определялись пределы размеров малых, средних, крупных клеток. Расчет показал, что площадь малых клеток в корковом веще-

стве тимуса животных контрольной группы составляет 23,7 до 57,5 мкм², средних – 57,6–149,3 мкм², больших – от 149,4 мкм² и более. В мозговом веществе долек площадь малых клеток находилась в пределах 30,3–52,7 мкм², средних – 52,8–139,5 мкм², больших – от 139,6 мкм², на границе коркового и мозгового вещества площадь малых клеток находилась в пределах от 36,7 до 54,7 мкм², средних – 54,8–134,0 мкм², больших – от 134,1 мкм². Так как, размер SP-позитивных клеток варьирует от 23,7 до 149,4 мкм², можно предположить, что это могут быть как макрофаги, так и лимфоциты [9, 11].

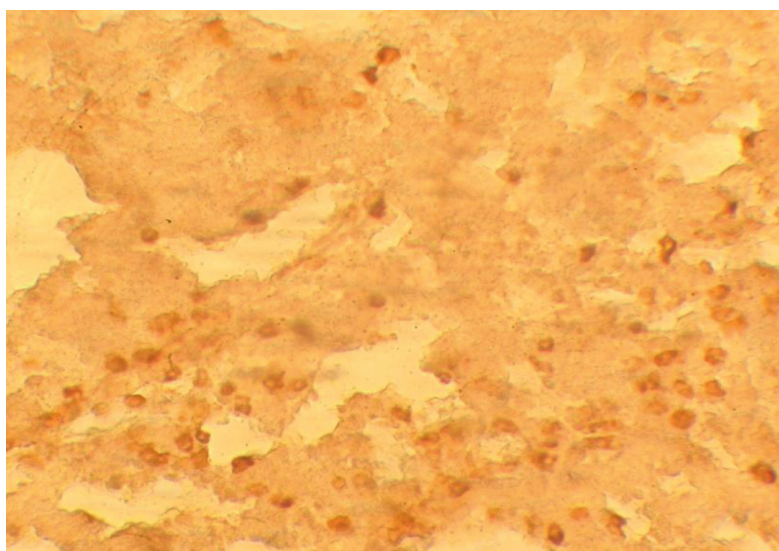


Рис. 1. SP-позитивные клетки на границе коркового и мозгового вещества тимуса животных контрольной группы. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10

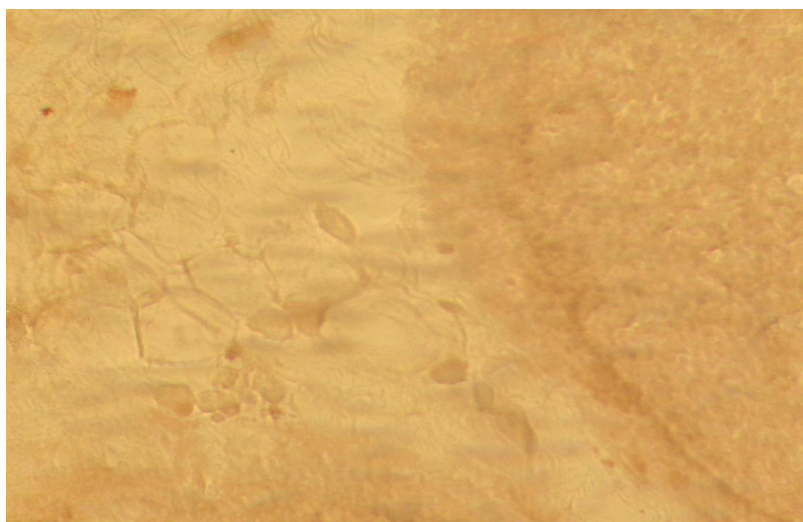


Рис. 2. Долька тимуса животных опытной группы. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. SP-позитивные тучные клетки

При оценке морфологии SP-позитивных клеток тимуса животных опытной группы уменьшалось количество мелких и увеличивалось число средних клеток в мозговом, корковом веществе долек тимуса и на границе между корковым и мозговым веществом, 69,7%, 76,3% и 74,0% соответственно при 66,2%, 52,6% и 57,6% в контроле (табл. 1, 2, 3). Таким образом, длительное поступление солей кальция с питьевой водой приводит к уменьшению лимфоцитов SP рецепторами и увеличению SP-позитивных макрофагов во всех структурах долек тимуса.

Таблица 1
Распределение SP-позитивных клеток в корковом веществе долек тимуса с учетом их размеров (в мкм²) (контрольных и опытных животных)

Размер клеток \ Группа животных	контрольная	опытная
маленькие: 23,7–57,5	15 (26,3%)	14 (17,5%)
средние: 57,6–149,3	30 (52,6%)	61 (76,3%)
большие: 149,4 и более	12 (21,1%)	5 (6,2%)
Всего клеток:	57	80

Таблица 2
Распределение SP-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса с учетом их размеров (в мкм²) (контрольных и опытных животных)

Размер клеток \ Группа животных	контрольная	опытная
маленькие: 30,3–52,7	14 (21,5%)	5 (8,9%)
средние: 52,8–139,5	43 (66,2%)	39 (69,7%)
большие: 139,6 и более	8 (12,3%)	12 (21,4%)
Всего клеток:	65	56

Таблица 4
Площади SP-позитивных клеток в дольках тимуса экспериментальных животных ($M \pm \sigma$ мкм²)

Группа животных \ Морфофункциональная зона	Корковое вещество долек	Мозговое вещество долек	Граница коркового и мозгового вещества долек
контрольная	105,18 ± 9,23	101,43 ± 8,43	82,85 ± 4,31
опытная	88,09 ± 4,85*	115,61 ± 7,65	103,86 ± 5,89*

Примечание. * – различия достоверны с контрольной группой ($p < 0,01$).

Таблица 3
Распределение SP-позитивных клеток на границе между корковым и мозговым веществом долек тимуса с учетом их размеров (в мкм²) (контрольных и опытных животных)

Размер клеток \ Группа животных	контрольная	опытная
маленькие: 36,7–54,7	15 (22,7%)	10 (13,7%)
средние: 54,8–134,0	38 (57,6%)	54 (74,0%)
большие: 134,1 и более	13 (19,7%)	9 (12,3%)
Всего клеток:	66	73

Увеличение средних размеров клеток отразилось и на среднем диаметре SP-позитивных клеток. У животных опытной группы на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса площадь клеток достоверно ($p < 0,01$) превышала таковую у контрольных животных. В корковом веществе долек тимуса, наблюдается обратная картина, площадь клеток достоверно ($p < 0,01$) уменьшается с $105,18 \pm 9,23$ мм² до $88,09 \pm 4,85$ мм² (табл. 4).

Анализ полученных данных показал, что поступление в организм лабораторных крыс с питьевой водой соединения кальция повышает экспрессию SP-рецепторов клетками тимуса. Об этом свидетельствует увеличение площади SP-позитивных клеток как в мозговом веществе, так и на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса. В научной литературе имеются данные об участии SP в процессах пролиферации и дифференцировки развивающихся тимоцитов, тучных клеток и других иммунокомпетентных клеток тимуса [1]. Наши результаты исследования показали адаптационные изменения структур долек тимуса на поступление соли кальция и усиление пролиферации и дифференцировки тимоцитов.

Выводы

1. В корковом веществе долек тимуса опытной группы лабораторных крыс происходит значительное увеличение численного состава SP-позитивных клеток, вместе с тем наблюдается уменьшение их площади и объема.

2. На границе коркового и мозгового вещества долек тимуса лабораторных животных наблюдаются увеличение количества SP-позитивных клеток, укрупнение их размера и объема.

Список литературы

1. Артемьева И.Л., Сергеева В.Е. Морфофункциональная характеристика структур тимуса при экспериментальной тестэктомии. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – 96 с.

2. Дьячкова И.М. Некоторые адаптационные реакции тимуса на поступление кальция и кремния / И.М. Дьячкова, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева, С.П. Сапожников. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2014. – 140 с.

3. Искендеров Б.Г. Артериальная гипертензия и метаболизм кальция: Монография. – Пенза, 2010. – 224 с.

4. Николаева Т.И., Сперанский А.М., Сергеева В.Е. Влияние кальция на гистаминосодержащие структуры пейеровых бляшек // Современные проблемы химии и защиты окружающей среды. – Чебоксары: ЗАО «Порядок», 2007. – С. 109.

5. Семенов В.Ф., Карандашов В.И., Михайлова Т.А. Стресс и старение человека // Вестник академии естественных наук. – 2011. – № 4. – С. 72–78.

6. Сокол А.В. Исследование иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе человека // Новые технологии в медицине. – 2010. – С. 116–120.

7. Соколова И.С., Дьячкова И.М., Сергеева В.Е., Сапожников С.П. Морфометрические изменения структур тимуса при экспериментальном хроническом введении кальция // Наука и инновации-2010 ISS «SI-2010»: мат. V междунар. науч. школы. – Йошкар-Ола, 2010. – С. 298–302.

8. Kendall M.D., Al-Shawaf A.A. Innervation of the rat thymus gland // Brain, Behavior, Immunity. – 1991. – № 5. – P. 9–28.

9. Lorton D., Bellinger D.L., Felten S.Y., Felten D.L. Substance P Innervation of the rat thymus // Peptides. – 1990. – № 11. – P. 1269–1275.

10. Piotrowski W. Action of the SP2-11 and SP3-11 fragments of substance P on rat peritoneal mast cells // Agents Actions. – 1987. – Vol. 20. – P. 178–180.

11. Silva A.B., Aw D., Palmer D.B. Functional analysis of neuropeptides in avian thymocyte development // J. Immunol. – 2008. – № 32. – P. 410–420.