

УДК 576.3/7:591.147.3:599.323.41:533.6.013.8  
 © Мороз Г.А., Шаповалова Е.Ю., 2011

## ЛЕКТИНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА КРЫС ПРИ СИСТЕМАТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПЕРГРАВИТАЦИИ

**Мороз Г.А., Шаповалова Е.Ю.**

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.П. Георгиевского»

**Мороз Г.А., Шаповалова Е.Ю.** Лектиногистохимическая характеристика лимфоцитов тимуса крыс при систематическом воздействии гипергравитации // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 187-190.

Изучены особенности распределения рецепторов лектинов PNA, RCA, SNA и SBA в лимфоцитах тимуса ювенильных крыс-самцов линии Вистар, которых на протяжении 10, 30 и 45 дней подвергали систематическому воздействию (10 мин) гравитационных перегрузок (9g). На основании изменения экспрессии гликополимеров установлено, что хронический стресс, вызванный систематическим воздействием гипергравитации, оказывает существенное влияние на морфофункциональное состояние тимуса крыс, разбалансируя равновесную систему адгезия-миграция T-лимфоцитов, своеобразную в каждой зоне железы, и изменяет, тем самым, иммунологический статус организма. Влияние гравитационных перегрузок наиболее заметно при 10-кратном воздействии, когда затронутыми оказываются все зоны тимуса. Через 30 дней систематического воздействия гипергравитации наиболее выраженным изменениям подвержена субкапсулярная зона тимуса, а через 45 дней – кортико-медулярная и мозговая вещества. Одновременно во всех морфофункциональных зонах железы уменьшается способность лимфоцитов образовывать упорядоченные структуры с микроокружением, что, несомненно, нарушает процессы лимфоцитопоэза.

**Ключевые слова:** морфология тимуса крысы, лектины, гипергравитация.

**Мороз Г.О., Шаповалова О.Ю.** Лектиногистохімічна характеристика лімфоцитів тимуса щурів при систематичній дії гіпергравітації // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 187-190.

Вивчені особливості розподілу рецепторів лектинів PNA, RCA, SNA і SBA в лімфоцитах тимуса ювенільних щурів-самців лінії Вістар, яких упродовж 10, 30 і 45 днів піддавали систематичній дії (10 хв) гравітаційних перевантажень (9g). На підставі зміни експресії глікополімерів встановлено, що хронічний стрес, викликаний систематичною дією гіпергравітації, суттєво впливає на морфофункціональний стан тимуса щурів і розбалансовує рівноважну систему адгезія-міграція Т-лімфоцитів, своєрідну в кожній зоні залози, та змінює тим самим імунологічний статус організму. Вплив гравітаційних перевантажень найпомітніший при 10-кратній дії, коли зачепленими виявляються всі зони тимуса. Через 30 днів систематичної дії гіпергравітації до найбільш виражених змін схильна субкапсулярна зона тимуса, а через 45 днів – кортико-медулярна і мозкова речовина. Одночасно у всіх морфофункціональних зонах залози зменшується здатність лімфоцитів утворювати впорядковані структури з мікрооточенням, що, безсумнівно, порушує процеси лімфоцитопоезу.

**Ключові слова:** морфологія тимуса щура, лектини, гіпергравітація.

**Moroz G.A., Shapovalova E.Yu.** Lectins histochemistry characterization of rat's thymus lymphocytes under regular exposure to hypergravity // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 187-190.

The features of the distribution of lectin receptors PNA, RCA, SNA and SBA in the thymus lymphocytes of juvenile male Wistar rats, subjected to gravitational overload (9g) systematic effects (10 min) for 10, 30 and 45 days, were investigated. Based on changes in the glycopolymers expression there was found that chronic stress caused by systemic exposure to hypergravity has a significant effect on the morphofunctional state of the rat's thymus, disbalanced an adhesion-migration system of the T-cells, specific for the each zone, and thus alters the organism immunological status. The influence of the gravity overload is most prominent with 10-day experiment, when all thymic zones are affected. After 30 days of the systematic hypergravity exposure subcapsular zone is affected most of all, and after 45 days - the cortico-medullary zone and medulla. At the same time at all thymic morphofunctional zones lymphocytes ability to form arranged structures along with the microenvironment is decreased, that is undoubtedly violating lymphocytopoiesis processes.

**Key words:** rat's thymus morphology, lectins, hypergravity.

В настоящее время особый интерес представляют вопросы реактивности организма на воздействие экстремальных факторов высотного и космического полета, одним из которых являются гравитационные перегрузки. Известно, что одну из ведущих ролей в обеспечении приспособительных реакций организма на действие гипергравитации выполняет иммунная система и, в частности, центральный орган иммуногенеза – тимус [2, 7]. От морфофункционального состояния вилочковой железы зависит поддержание гомеостаза в организме и обеспечение стабильности его антигенных структур. В последние годы появились публикации, доказывающие, что ключевую роль в процессах морфогенеза играют углеводные остатки, входящие в состав гликопротеинов клетки и обеспечивающие межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия. Изменение углеводного компонента мембранного и цитоплазматического рецепторного аппарата клеток может привести к необратимым морфофункциональным нарушениям [1, 3, 6]. Не являются исключением и клетки им-

мунных органов. Изучение процессов гликозилирования и выяснение причин их нарушения позволяет судить не только о морфологии и степени дифференцировки иммунокомпетентных клеток, но и об уровне их функциональной активности и способности к миграции, а значит, и о иммунологической резистентности организма в целом [5, 8, 9]. Однако, на сегодняшний день в научной литературе отсутствуют данные об особенностях количественной гистопографии рецепторов лектинов в тимусе при гипергравитационном воздействии.

**Цель исследования.** Изучить экспрессию и репрессию гликополимеров – рецепторов лектинов на поверхности и в цитоплазме лимфоцитов тимуса ювенильных крыс при систематическом воздействии гравитационных перегрузок.

**Материал и методы исследования.** Исследование проведено на 36 ювенильных (2-месячные, с исходной массой 120-130 г) крысах-самцах линии Вистар. Изучали изменение состава и локализации отдельных углеводных детерминант на клеточных

мембранах и в цитоплазме лимфоцитов разных морфофункциональных зон тимуса (субкапсулярная – СК, собственно кора – К, кортико-медуллярная – КМ и мозговое вещество – МВ). Животные в зависимости длительности эксперимента (10, 30 и 45 дней) были разделены на три серии опытов по 12 крыс в каждой: 6 – контроль, 6 – эксперимент. Экспериментальных крыс подвергали ежедневному 10-минутному воздействию гравитационных перегрузок величиной 9 g. Гипергравитация моделировалась путем вращения животных в периферических контейнерах центрифуги Ц-2/500. Контрольные крысы не подвергались гравитационным перегрузкам. Эксперимент и забой крыс был выполнен с соблюдением действующих биоэтических норм.

Забор материала и приготовление гистологических препаратов выполняли согласно общепринятым методикам работы с лимфоидными органами. Готовили серийные срезы толщиной 4–6 мкм. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Гликополимеры лимфоцитов выявляли путем обработки срезов лектинами: арахиса (PNA), специфичного к  $\beta$ -D-галактозе; бузины черной (SNA), специфичного к концевым нередуцирующим остаткам N-ацетилнейраминной кислоты гликополимеров; сои (SBA), специфичного к N-ацетил-D-галактозамину; клецевины (RCA), специфичного к  $\beta$ -D-галактозе, экранированной сиаловой кислотой; конъюгированных с пероксидазой хрена. Препараты обрабатывали с применением стандартных наборов НПК «Лектинотест» (г. Львов) в разведении лектина 1:50 по методике [4]. Визуализацию мест связывания лектина проводили в системе «диаминбензидин-перекись водорода». Контроль специфичности реакции осуществляли путем исключения из схемы обработки препаратов диаминбензидина. Интенсивность окрашивания срезов различными лектинами (отложение бензидиновой метки) оценивалась полуколичественным методом в баллах: 0 баллов – отсутствие реакции, 1 балл – слабая реакция, 2 балла – умеренная реакция, 3 балла – сильная реакция и 4 балла – очень сильная реакция.

**Таблица 1.** Содержание рецепторов лектинов в лимфоцитах тимуса (10-дневный эксперимент)

Лектин	Локализация рецепторов	Контроль				Эксперимент			
		СК	К	КМ	М	СК	К	КМ	М
PNA	цитолемма	3	3	3	2	2	2	1	0
	цитоплазма	2	2	2	1	1	1	1	0
RCA	цитолемма	2	2	3	4	4	4	4	4
	цитоплазма	1	1	2	3	3	3	4	4
SNA	цитолемма	2	2	3	4	4	4	4	4
	цитоплазма	1	1	2	3	3	3	4	4
SBA	цитолемма	3	3	1	0	2	2	1	0
	цитоплазма	2	2	1	0	1	1	0	0

Через 10 дней систематического воздействия гравитационных перегрузок количество рецепторов лектина арахиса в лимфоцитах всех слоев коры уменьшается до умеренного на цитолемме и малого в цитоплазме, свидетельствуя, тем самым, о снижении адгезии клеток. Экспрессия сиалоконъюгатов (рецепторов лектинов RCA и SNA) в поверхностной коре резко возрастает до очень сильной реакции на цитолемме и сильной в цитоплазме, а в кортико-медуллярной зоне сохраняется на уровне контроля. Количество рецепторов лектина сои уменьшается и становится умеренным на цитолемме и малым в цитоплазме. При этом на границе с мозговым веществ-

**Результаты собственных исследований.** Анализ распределения рецепторов лектинов в лимфоцитах тимуса контрольных крыс 10-дневной серии опытов выявил, что в поверхностных слоях коры, включая субкапсулярную зону, лимфоциты экспрессируют на цитолемме большое количество (сильная реакция) галактозаминоконъюгатов, являющихся рецепторами лектина арахиса, обеспечивающих высокие адгезивные свойства лимфоцитов, и умеренное количество в цитоплазме. Сиалоконъюгаты, являющиеся рецепторами лектинов клецевины и бузины черной и обуславливающие миграционную активность лимфоцитов, одинаково умеренно присутствуют на цитолемме. В цитоплазме клеток – их меньше (умеренная реакция). При этом лимфоциты образуют высоко упорядоченные структуры с микроокружением, что подтверждается экспрессией большого количества N-ацетил-D-галактозаминоконъюгатов – рецепторов лектина сои на их цитолемме, тогда как в цитоплазме таких биополимеров меньше. Лимфоциты кортико-медуллярной зоны также экспрессируют на цитолемме большое количество галактозаминоконъюгатов и умеренное количество в цитоплазме. При этом, сиалоконъюгатов, в сравнении с поверхностными слоями коры, на цитолемме выявляется большое количество, а в цитоплазме – умеренное, что свидетельствует о большей миграционной способности клеток. Лимфоциты этой зоны тимуса не способны образовывать стабильные структуры с микроокружением, что подтверждается слабой экспрессией рецепторов лектина сои как на цитолемме, так и в цитоплазме. Тимоциты мозгового вещества характеризуются низкими адгезивными свойствами, что подтверждается умеренным количеством рецепторов лектина арахиса на цитолемме и малым количеством в цитоплазме. Очень много мест связывания рецепторов лектинов клецевины и бузины черной присутствуют на цитолемме и в цитоплазме, при этом T-лимфоциты неактивны по отношению лектина сои (табл. 1).

вом в цитоплазме лимфоцитов N-ацетил-D-галактозаминоконъюгаты редуцируются, сохраняясь в малых количествах только на цитолемме клеток (слабая реакция). В мозговом веществе адгезивные способности T-лимфоцитов снижаются настолько, что рецепторы лектина арахиса не экспрессируются. Количество сиалоконъюгатов увеличивается до максимально яркой бензидиновой метки на цитолемме и в цитоплазме. После обработки срезов лектином сои окраска в лимфоцитах не выявляется (см. табл. 1).

Таким образом, можно констатировать, что стресс-реакция при 10-дневном гипергравитацион-

ном воздействии затрагивает все структурные зоны тимуса. Миграционные свойства тимоцитов возрастают, а адгезивные – снижаются. Резко снижается и способность лимфоцитов образовывать упорядоченные структуры с микроокружением, что нарушает процессы созревания и дифференцировки лимфоцитов.

У контрольных животных второй серии опытов (30 дней) лимфоциты тимуса так же, как и в предыдущей серии, характеризуются наличием рецепторов всех примененных лектинов. При этом, отмечаются некоторые отличия в интенсивности реакции. Так, лимфоциты поверхностных слоев коры при большом количестве рецепторов лектина арахиса на цитолемме, в цитоплазме экспрессируют очень много галактозаминоконъюгатов. Количество мест связывания на цитолемме клеток лектина клебселины, специфичного к углеводной детерминанте бета-D-галактозе, экранированной сиаловой кислотой, –

высокое, а в цитоплазме умеренное. Плотность сайтов связывания лектина сои умеренная на цитолемме и высокая в цитоплазме. Лимфоциты кортико-медулярной зоны характеризуются более высокой способностью к миграции, чем клетки поверхностной коры, и в сравнении с предыдущей серией опытов, проявляют более выраженную реакцию на сиалоконъюгаты. Рецепторы лектинов клебселины и бузины черной присутствуют в очень большом количестве на цитолемме лимфоцитов и в большом количестве в цитоплазме. При этом они демонстрируют умеренную способность образовывать упорядоченные структуры с микроокружением. Тимоциты мозгового вещества обладают одинаково невыраженными адгезивными и миграционными возможностями, а также слабой связью с клетками микроокружения. Рецепторы лектинов арахиса, бузины черной и сои умеренно экспрессируются на цитолемме клеток и слабо в их цитоплазме (табл. 2).

**Таблица 2.** Содержание рецепторов лектинов в лимфоцитах тимуса (30-дневный эксперимент)

Лектин	Локализация рецепторов	Контроль				Эксперимент			
		СК	К	КМ	М	СК	К	КМ	М
PNA	цитолемма	4	4	3	2	4	3	4	2
	цитоплазма	3	3	2	1	3	2	3	1
RCA	цитолемма	3	4	4	3	2	3	3	1
	цитоплазма	2	3	3	2	1	2	2	0
SNA	цитолемма	2	3	4	2	4	2	3	2
	цитоплазма	1	2	3	1	3	3	2	1
SBA	цитолемма	2	2	2	2	4	4	3	1
	цитоплазма	3	3	1	1	3	3	2	0

30-дневное воздействие гипергравитации приводит к изменению спектра биополимерных молекул с углеводными детерминантами лимфоцитов субкапсулярной зоны, затрагивая рецепторы лектинов клебселины, бузины черной и сои. Их количество, в сравнении с контролем, резко возрастает на цитолемме и в цитоплазме. Количество галактозаминоконъюгатов не изменяется. Значительным образом изменяется плотность мест связывания изученных лектинов и во внутренней коре. Количество рецепторов лектина арахиса уменьшается и становится относительно высоким на цитолемме и умеренным в цитоплазме. Миграционные способности лимфоцитов не изменяются. Содержание N-ацетил-D-галактозаминоконъюгатов увеличивается до очень большого на цитолемме и большого в цитоплазме. Сильно увеличивается адгезивная способность лимфоцитов. В тимоцитах кортико-медулярной зоны синтезируется большое количество биополимеров с концевыми нередуцирующими остатками  $\beta$ -D-галактозы, что сильно увеличивает их адгезивные способности. Миграционные возможности лимфоцитов при этом снижаются за счет редукции до малого количества рецепторов лектина бузины черной в цитоплазме. На цитолемме таких соединений экспрессируется умеренное количество. Способность образовывать упорядоченные структуры с микроокружением остается невысокой. В лимфоцитах мозгового вещества заметных изменений в экспрессии изученных лектинов не наблюдается. Вместе с тем, тимоциты теряют рецепторы лектина сои (см. табл. 2).

Таким образом, следует отметить, что 30-кратное воздействие гравитационных перегрузок мало изменяет адгезивные способности лимфоцитов коры. Заметные изменения выявляются лишь в глубоких

слоях и на границе с мозговым веществом. Миграционные способности клеток лимфоцитарного ряда также изменяются мало, резко возрастая только в субкапсулярной зоне. В свою очередь, способность образовывать упорядоченные структуры с клетками микроокружения изменяется во всех зонах: в поверхностной коре, включая субкапсулярную зону, увеличивается, а в кортико-медулярной зоне и в мозговом веществе снижается. В целом, наиболее выраженным изменениям подвержена субкапсулярная зона тимуса.

В контроле третьей серии опытов лектиногистохимическая характеристика лимфоцитарного компонента поверхностной коры тимуса крыс существенно не отличается от контрольных данных двух предыдущих серий. В лимфоцитах субкапсулярной зоны коры очень высокая плотность мест связывания лектина PNA на цитолемме и высокая в цитоплазме. Экспрессия рецепторов лектинов клебселины, бузины черной и сои ниже и ограничивается умеренной реакцией в цитоплазме клеток и относительно слабой на цитолемме. Во внутренней коре лимфоциты характеризуются высокой концентрацией рецепторов лектинов арахиса и сои на цитолемме и умеренной в цитоплазме. Количество сиалоконъюгатов соответствует данным контрольных крыс предыдущей серии опытов. В кортико-медулярной зоне экспрессия рецепторов лектина арахиса в цитоплазме лимфоцитов умеренная, на цитолемме – высокая. Для лектинов клебселины и бузины черной свойственна та же экспрессия, что и в аналогичной группе животных 30-дневного эксперимента, при этом количество биополимеров с концевыми остатками N-ацетил-D-галактозамина, в целом, очень высокое. В мозговом веществе плотность сайтов связывания лектина арахиса, клебселины и бузины черной умеренное в цитоплазме и большое на цитолемме лим-

фоцитов. Экспрессия рецепторов лектина сои в цитоплазме клеток низкая (табл. 3).

**Таблица 3.** Содержание рецепторов лектинов в лимфоцитах тимуса (45-дневный эксперимент)

Лектин	Локализация рецепторов	Контроль				Эксперимент			
		СК	К	КМ	М	СК	К	КМ	М
PNA	цитолемма	4	3	3	3	3	4	4	4
	цитоплазма	3	2	2	2	2	3	3	3
RCA	цитолемма	3	4	4	3	3	4	4	3
	цитоплазма	2	3	3	2	2	3	3	2
SNA	цитолемма	2	3	3	3	2	3	3	3
	цитоплазма	1	2	2	2	1	2	2	2
SBA	цитолемма	3	3	3	3	3	3	2	2
	цитоплазма	2	2	4	1	2	2	1	1

После 45-дневного систематического воздействия гипергравитации лимфоциты субкапсулярной зоны тимуса несколько уменьшают количество галактозаминоконъюгатов, связанных с возможностями адгезии клеток, до умеренных значений в цитоплазме и высоких на цитолемме. При этом, миграционные способности клеток и возможность образовывать упорядоченные структуры с микроокружением, в сравнении с контролем, не изменяются. Во внутренней коре адгезивные способности лимфоцитов возрастают. Бензидиновая метка выявляется очень яркой на цитолемме и яркой в цитоплазме. Спектр остальных изученных лектинов остается без изменений. В кортико-медулярной зоне изменяется только экспрессия рецепторов лектинов арахиса и сои. Количество галактозаминоконъюгатов увеличивается до очень большого на цитолемме и большого в цитоплазме, увеличивая тем самым адгезивные свойства лимфоцитов. Вместе с тем способность образовывать упорядоченные структуры с микроокружением существенно уменьшается. Количество N-ацетил-D-галактозаминоконъюгатов умеренно на цитолемме и мало в цитоплазме. В мозговом веществе адгезия лимфоцитов увеличивается до высоких показателей. Яркость бензидиновой метки очень высокая на цитолемме и высокая в цитоплазме. Миграционные способности не изменяются по сравнению с контролем. Способность образовывать упорядоченные структуры снижается. Количество рецепторов лектина сои умеренно на цитолемме и мало в цитоплазме (см. табл. 3).

Таким образом, при многократных (45 сеансов) гравитационных перегрузках адгезивные способности лимфоцитов существенно изменяются во всех зонах тимуса. В субкапсулярной зоне они уменьшаются. В остальных зонах возможность адгезии, наоборот, увеличивается. При этом, миграционные способности по сравнению с контролем не изменяются, так же, как и способность образовывать упорядоченные структуры. Изменения относительно последнего наблюдаются только в кортико-медулярной зоне и мозговом веществе тимуса.

**Заключение.** Хронический стресс, вызванный систематическим гипергравитационным воздействием, оказывает существенное влияние на морфофункциональное состояние тимуса ювенильных крыс, разбалансируя равновесную систему адгезия-миграция Т-лимфоцитов, своеобразную в каждой зоне железы, и изменяет, тем самым, иммунологический статус организма. Влияние гравитационных перегрузок наиболее заметно при 10-кратном воздействии, когда затронутыми оказываются все зоны тимуса. Через 30 дней систематического воздействия

гипергравитации наиболее выраженным изменениям подвержена субкапсулярная зона, а через 45 дней – кортико-медулярная зона и мозговое вещество тимуса. Одновременно во всех морфофункциональных зонах железы уменьшается способность лимфоцитов образовывать упорядоченные структуры с микроокружением, что, несомненно, нарушает процессы лимфоцитопоеза.

В дальнейшем планируется проведение лектиногистохимических исследований не только тимуса, но и селезенки крыс разного возраста, подвергавшихся систематическому воздействию гравитационных перегрузок.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Волошин Н.А. Использование методов лектиновой гистохимии в морфологии / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева, М.А. Довбыш // Таврич. медико-биол. вестн. – 2004. – Т. 7, № 4, ч. 1. – С. 40-41.
2. Ерофеева Л.М. Особенности цитоархитектоники тимуса крыс при повторном воздействии гипергравитации / Л.М. Ерофеева, И.Б. Краснов, М.Р. Сапин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 8. – 218-221.
3. Куц О.Г., Волошин М.А. Методика вивчення популяції  $\gamma\delta$ -Т-лімфоцитів із використанням панелі лектинів / О.Г. Куц, М.А. Волошин // Вісник морфології. 2010. – Т. 16, № 1. – С. 76-80.
4. Луцк А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцк, Е.С. Деток, М.Д. Луцк. – Львов: Вища школа. – 1989. – 140 с.
5. Яценко А.М. Цитотопографія рецепторів лектинів у структурних компонентах органів імунотенезу / А.М. Яценко, В.О. Антонюк, О.В. Наконечна [та інші.] // Львівський медичний часопис. – 2005. – Т. 11, № 3. – С. 96-100.
6. Яценко А.М. Рецептори фукозоспецифічних лектинів в структурних компонентах окремих органів / А.М. Яценко, О.В. Смольникова, О.Д. Луцк // Таврич. медико-биол. вестн. – 2002. – Т. 5, № 3. – С. 174-176.
7. Elmore S.A. Enhanced histopathology of the thymus / S.A. Elmore // Toxicol Pathol. – 2006, N 34(5). – P. 656-665.
8. Sasseti C. Identification of Podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD 34 / C. Sasseti, K. Tangemann, M.S. Singer // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 187, N 12. – P. 1965-1975.
9. Steinman R.M. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs / R.M. Steinman, M. Pack, K. Inaba // Immunol Rev. – 1997. – Vol. 156. – P. 25-37.

Надійшла 12.09.2011 р.

Рецензент: доц. В.М.Волошин