

УДК 611.08

<https://doi.org/10.17816/MAJ19181-84>

ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУНОПОЗИТИВНЫХ БЕТА-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ADRB2 (GLN247-SER262) В ЛЕГКИХ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР

М.А. Сырцова, Д.Э. Коржевский

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Для цитирования: Сырцова М.А., Коржевский Д.Э. Выявление иммунопозитивных бета-адренергических структур при помощи поликлональных антител к ADRB2 (Gln247-Ser262) в легких крыс линии Вистар // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 1. – С. 81–84. <https://doi.org/10.17816/MAJ19181-84>

Поступила: 20.12.2018

Одобрена: 30.01.2019

Принята: 28.02.2019

Цель исследования состояла в выявлении ADRB2-иммунопозитивных структур в легких крыс в норме.

Материал и методы. Материалом для исследования служили легкие половозрелых крыс-самцов ($n = 6$) с верифицированным отсутствием признаков воспаления. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде по стандартной методике. Выявление ADRB2-иммунопозитивных структур проводили с помощью метода иммуногистохимии.

Результаты. В ходе работы было выявлено интенсивное и селективное окрашивание апикальной части воздухоносного эпителия бронхов, отражающее преимущественное распределение ADRB2-иммунопозитивных структур в крупных и средних бронхах и частично в терминальных бронхиолах внутрилегочных воздухоносных путей. ADRB2-иммунопозитивные структуры характеризовались четкими границами, со слегка расплывчатым ореолом, имели округлую или сильно вытянутую овальную форму. Размер структур варьировал в зависимости от калибра бронха, в котором они были локализованы.

Заключение. В результате исследования были обнаружены специфические ADRB2-иммунопозитивные структуры, локализованные в эпителии дыхательных путей. Было показано, что ADRB2-иммунопозитивные структуры в легком крысы располагаются в крупных и средних бронхах, кроме того, в части случаев позитивную реакцию наблюдали и в терминальных бронхиолах. Была выявлена специфичная реакция эпителия бронхов, которая во всех случаях наблюдалась в апикальной части эпителия бронхов. Кроме того, было продемонстрировано, что использованные в нашем исследовании поликлональные антитела селективно выявляют ADRB2-иммунопозитивные структуры только в эпителии бронхов, не вступая в иммуногистохимическое взаимодействие с бета-2-адренорецепторами гладких мышц, что, видимо, обусловлено более высокой концентрацией иммунореактивного продукта в эпителиальных клетках в сравнении с гладкомышечными.

Ключевые слова: ADRB2; антитела к ADRB2 (Gln247-Ser262); бета-2-адренорецепторы; бронхиальная астма.

REVEALING OF IMMUNOPOSITIVE BETA-ADRENERGIC STRUCTURES, USING POLYCLONAL ANTIBODIES TO ADRB2 (GLN247-SER262) IN THE LUNGS OF RATS

M.A. Syrczova, D.E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Syrczova MA, Korzhevskii DE. Revealing of immunopositive beta-adrenergic structures, using polyclonal antibodies to ADRB2 (Gln247-Ser262) in the lungs of rats. *Medical Academic Journal*. 2019;19(1):81-84. <https://doi.org/10.17816/MAJ19181-84>

Received: December 20, 2018

Revised: January 30, 2019

Accepted: February 28, 2019

The aim of this research was to identify ADRB2-immunopositive structures in the lungs of intact rats.

Materials and methods. The material for the study were the lungs of adult male rats ($n = 6$) with a verified absence of signs of inflammation. The obtained material was fixed in zinc-ethanol-formaldehyde by a standard procedure. Identification of ADRB2-immunopositive structures was performed using the immunohistochemistry method.

Results. The study revealed the intensive and selective diffuse staining of the apical part of the bronchial airway epithelium, reflecting the preferential distribution of ADRB2-immunopositive structures in the large and medium bronchi and partially in the terminal bronchioles of the intrapulmonary airways. The ADRB2-immunopositive structures were characterized by clear boundaries, with a slightly vague halo, and having a rounded or strongly elongated oval shape. The size of the identified structures varied depending on the caliber of the bronchi, in which they were localized.

Conclusion. This research identified specific ADRB2-immunopositive structures localized in the epithelium of the respiratory tract. In addition, it was demonstrated that polyclonal antibodies used in the research selectively detect

Список сокращений

БА — бронхиальная астма; ADRB2 — бета-2-адренорецепторы; GPCRs — G-белок-сопряженный рецептор.

ADRB2-immunopositive structures only in the bronchial epithelium, without engaging in immunohistochemically interaction with beta-2 smooth muscle adrenergic receptors, which is apparently due to a higher concentration of the immunoreactive product in epithelial cells compared to smooth muscles.

Keywords: ADRB2; antibodies of ADRB2 (Gln247-Ser262); beta-2 adrenoreceptors; asthma.

Введение

Бета-2-адренорецепторы (ADRB2) относятся к большому семейству трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком, так называемых семиспиральных рецепторных структур (GPCRs). GPCRs выполняют функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигнала, которые в итоге вызывают клеточный ответ. Нарушение работы GPCRs приводит к возникновению множества различных патологических состояний, кроме того, данные структуры являются мишенью для большинства современных лекарственных препаратов. ADRB2 в основном представлены внесинаптическими рецепторами, а также имеются на пресинаптической мембране постганглионарных нейронов симпатического отдела нервной системы. Считается, что они локализованы на мембранах гладкомышечных клеток, главным образом в мышцах бронхиол и артериях скелетных мышц. Данные рецепторы (наряду с адренергическими рецепторами других типов) присутствуют в том числе и на клетках печени, скелетных мышц, слюнных желез, в жировой ткани, на мембранах лимфоцитов, тромбоцитов и тучных клеток и на клетках других тканей [1]. При этом выполняемые ими функции обусловлены их локализацией в определенной структуре организма.

Предполагают, что дисфункция бета-2-адренорецепторов является одним из триггеров, запускающих воспалительный процесс в легких, что обуславливает изменение уровня экспрессии данного рецептора в бронхах [2]. Результаты ряда экспериментальных исследований свидетельствуют об изменении уровня экспрессии ADRB2 в легких при развитии бронхиальной астмы (БА), ремиссии данного обструктивного заболевания [2] и на фоне длительной терапии агонистами бета-адренорецепторов [3–5]. Кроме того, мутации в гене *ADRB2* могут детерминировать развитие терапевтической резистентности при лечении БА [6].

При моделировании БА часто используют крыс линии Вистар [7] и овальбуминовую модель БА, однако данные о распределении бета-2-адренорецепторов у этих животных фрагментарны. Исследования затруднены отсутствием надежных видоспецифичных антител к данным рецепторам.

В связи с этим целью данной работы стало выявление ADRB2-иммунопозитивных струк-

тур у крыс линии Вистар при помощи новых поликлональных антител к ADRB2 (Gln247-Ser262), специфичных в отношении *Rattus norvegicus*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили легкие половозрелых крыс-самцов ($n = 6$). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, который обеспечивает высокую сохранность антигенных детерминант при проведении иммуногистохимической реакции и залит в парафин по общепринятой методике. Для общей характеристики легочных структур применяли классический гистологический метод окраски гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое выявление ADRB2-специфических структур проводили с помощью кроличьих поликлональных антител ADRB2 (Cloud-Clone Corp., США) в разведении 1 : 100 (иммуногеном является синтетический пептид, ADRb2 (Gln247-Ser262), конъюгированный с овальбумином). В качестве вторичных реагентов использовали Reveal-HR Conjugate (Spring Bio-Science, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для визуализации продукта иммуноцитохимической реакции применяли хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов окрашивали квасцовым гематоксилином и заключали в перманентную среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США). Полученные препараты исследовали с помощью микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия), фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Результаты и их обсуждение

При анализе препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, в легких не были обнаружены признаки патологии и воспаления. При иммуногистохимическом выявлении антителами к ADRB2 (Gln247-Ser262), специфичных в отношении *Rattus norvegicus*, было отмечено, что в легких ADRB2-иммунопозитивные структуры главным образом локализируются в крупных, средних и малых бронхах и частично в терминальных бронхиолах внутрилегочных воздухоносных путей (рис. 1, *a, b*). Основное место локализации — апикальная часть реснит-

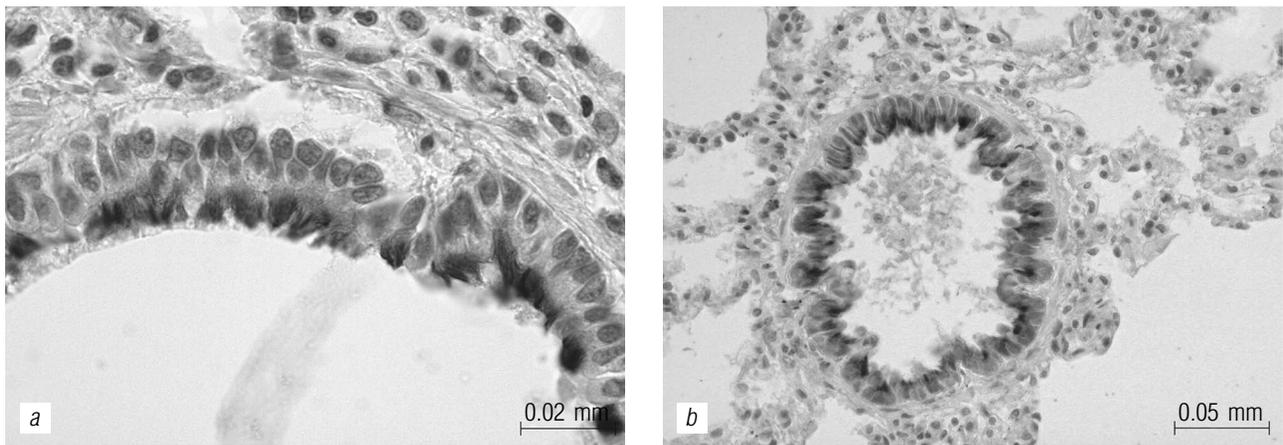


Рис. 1. ADRB2-иммунопозитивные структуры в среднем бронхе. Иммуногистохимическая реакция на ADRB2 с подкраской ядер квасцовым гематоксилином (линейный отрезок равен 0,02 мм) (a); ADRB2-иммунопозитивные структуры в малом бронхе. Иммуногистохимическая реакция на ADRB2 с подкраской ядер квасцовым гематоксилином (линейный отрезок равен 0,05 мм) (b)

Fig. 1. ADRB2-immunopositive structures in the middle bronchus. Immunohistochemical reaction to ADRB2 (hematoxylin staining), scale bar 0.02 mm (a); ADRB2-immunopositive structures in the small bronchus. Immunohistochemical reaction to ADRB2 (hematoxylin staining), scale bar 0.05 mm (b)

чатого эпителия бронхов. Продольная исчерченность выявляемых структур, наблюдаемая при большом увеличении (см. рис. 1, a), позволяет предположить, что положительная реакция связана с зоной локализации ресничек.

ADRB2-иммунопозитивные структуры характеризовались четкими границами, со слегка расплывчатым ореолом, имели округлую или сильно вытянутую овальную форму. Во всех представленных образцах (препаратов легких) данные структуры выявлялись селективно. Размер структур варьировал в зависимости от калибра бронха, в котором они были локализованы.

Особый интерес к исследованию адренергической регуляции бронхов вызван их ролью в патогенезе БА [8]. На сегодняшний день известно, что главным фактором, способствующим развитию данной обструктивной патологии легких, является повышенная реактивность бронхиального дерева [9, 10]. Она обусловлена нарушением вегетативной регуляции тонуса гладких мышц и действием медиаторов воспаления и приводит к периодической обратимой обструкции бронхов. Изменение экспрессии и активности бета-2-адренорецепторов, в свою очередь, влияет на развитие этого процесса [11]. При этом морфологических исследований, посвященных изучению распределения ADRB2 в легких животных и человека, выполнено мало, объем их недостаточен. В рамках представленной работы было показано, что ADRB2-иммунопозитивные структуры, обнаруживаемые при помощи антител к ADRB2 (Gln247-Ser262), специфичных в отношении крысы, локализованы в апикальной части реснитчатого эпителия крупных, средних и малых

бронхов и терминальных бронхиолах легких в апикальной части бронхиального эпителия. Структуризация иммуногистохимической реакции и ее расположение по отношению к эпителиальному пласту дают возможность предположить, что выявляется зона расположения ресничек в клетках мерцательного эпителия. Это противоречит существующим представлениям о типичной локализации адренорецепторов. Так, согласно подавляющему большинству литературных данных бета-2-адренорецепторы в легком в основном находятся в гладкой мускулатуре бронхов и частично на мембране тучных клеток. В то же время можно найти работы, в которых данный вид адренергических рецепторов обнаруживали на поверхности альвеолярного эпителия [12]. Кроме того, в своей последней работе Nguyen et al. показали, что ADRB2-иммунопозитивные структуры представлены в эпителии воздухоносных путей и количество данных рецепторов сопоставимо с количеством экспрессируемых рецепторов в гладкой мускулатуре бронхов [4]. В нашем исследовании продукт иммуногистохимической реакции селективно выявлялся в эпителии бронхов, что отчасти подтверждает полученные ранее результаты, но в отличие от других работ мы не обнаружили иммунореактивности в мышечной пластинке слизистой оболочки бронхов.

Возможно, выявленная специфическая реакция именно в воздухоносном эпителии бронхов обусловлена существованием нескольких изоформ данного рецептора, среди которых только одна обнаруживается при помощи исходных антител. Можно также предположить, что причина отсутствия четкой реакции в мы-

шечной пластинке слизистой оболочки бронхов заключается в более низкой концентрации выявляемого антигена по сравнению с эпителием.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе впервые были выявлены специфические ADRB2-иммунопозитивные структуры, локализованные в поверхностной области эпителия дыхательных путей крысы. Было показано, что ADRB2-иммунопозитивные структуры в легком крысы, реагирующие с вышеупомянутыми антителами, преимущественно локализуются в крупных, средних и малых бронхах. Иммуногистохимическая реакция с использованием данных антител характеризовалась высокой специфичностью и отсутствием фона.

Литература

1. Nasser Y, Ho W, Sharkey KA. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. *J Comp Neurol*. 2006;495(5):529-553. <https://doi.org/10.1002/cne.20898>.
2. Amrani Y, Bradding P. Beta2-adrenoceptor function in asthma. *Adv Immunol*. 2017;136:1-28. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.06.003>.
3. Chowdhury BA, Dal Pan G. The FDA and safe use of long-acting beta-agonists in the treatment of asthma. *N Engl J Med*. 2010;362(13):1169-1171. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1002074>.
4. Nguyen LP, Al-Sawalha NA, Parra S, et al. beta2-Adrenoceptor signaling in airway epithelial cells promotes eosinophilic inflammation, mucous metaplasia, and airway contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(43):E9163-E9171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710196114>.
5. Nguyen LP, Lin R, Parra S, et al. Beta2-adrenoceptor signaling is required for the development of an asthma phenotype in a murine model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2435-2440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810902106>.
6. Трофимов В.И., Миронова Ж.А., Дубина М.В. Генетический профиль терапевтически резистентной бронхиальной астмы // Медицинский академический журнал. — 2013. — Т. 13. — № 2. — С. 44–50. [Trofimov VI, Mironova ZA, Dubina MV. Genetic profile of therapy-resistant asthma. *Med Acad J*. 2013;13(2):44-45. (In Russ.)]
7. Ворончихин П.А., Сырцова М.А., Талантов С.В., и др. Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы // Биомедицина. — 2013. — № 2. — С. 42–51. [Voronchikhin PA, Syrtsova MA, Talantov SV, et al. Effect of metoprolol and bisoprolol on the course of experimental bronchial asthma. *Biomeditsina*. 2013;(2):42-51. (In Russ.)]
8. Lelliott A, Nikkar-Esfahani A, Offer J, et al. The role of extracellular-signal regulate kinase (ERK) in the regulation of airway tone in porcine isolated peripheral bronchioles. *Eur J Pharmacol*. 2012;674(2-3):407-414. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.042>.
9. Grayson MH, Feldman S, Prince BT, et al. Advances in asthma in 2017: Mechanisms, biologics, and genetics. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(5):1423-1436. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.033>.
10. Yarova PL, Stewart AL, Sathish V, et al. Calcium-sensing receptor antagonists abrogate airway hyperresponsiveness and inflammation in allergic asthma. *Sci Transl Med*. 2015;7(284):284ra260. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0282>.
11. Thanawala VJ, Forkuo GS, Al-Sawalha N, et al. beta2-Adrenoceptor agonists are required for development of the asthma phenotype in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(2):220-229. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-03640C>.
12. Koryakina YA, Fowler TW, Jones SM, et al. Characterization of a panel of six beta2-adrenergic receptor antibodies by indirect immunofluorescence microscopy. *Respir Res*. 2008;9:32. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-32>.

Сведения об авторах / Information about the authors

Марина Александровна Сырцова — научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ НИИЭМ, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-6974-4062>. SPIN-код: 7826-8133. E-mail: iemmorphol@yandex.ru.

Дмитрий Эдуардович Коржевский — д-р мед наук, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ НИИЭМ, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>. SPIN-код: 3252-3029. E-mail: iemmorphol@yandex.ru.

Marina A. Syrczova — research scientist, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Morphology Department, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6974-4062>. SPIN-code: 7826-8133. E-mail: iemmorphol@yandex.ru.

Dmitriy E. Korzhevskii — Doctor of Medical Sciences, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Morphology Department, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>. SPIN-code: 3252-3029. E-mail: iemmorphol@yandex.ru.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Марина Александровна Сырцова / Marina A. Syrczova
E-mail: iemmorphol@yandex.ru