

© Яглова Н.В., Обернихин С.С., 2013
УДК 591.3:591.441.443

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНОВ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА МЫШЕЙ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО
ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МАТЕРИНСКИЙ
ОРГАНИЗМ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ**

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, г. Москва

Однократная стимуляция иммунной системы материнского организма мышей панТ-клеточным митогеном конканавалином А на ранних сроках беременности до начала формирования органов иммунной системы плода приводит к нарушениям постнатального развития тимуса и селезенки у потомства. После окончания подсосного периода у мышей отмечалось увеличение количества тимических телец и ретикулоэпителиоцитов в их составе, снижение количества лимфоцитов в мозговом веществе тимуса и отставание темпов развития селезенки, что проявлялось меньшей степенью развития белой пульпы и более активным кроветворением.

Ключевые слова: *тимус, селезенка, конканавалин А.*

Развитие и становление иммунной системы в пре- и постнатальном периодах развития зависит от ряда факторов, из которых наименее изученным является воздействие реакции иммунной системы матери на морфогенез органов иммунной защиты плода. Рядом авторов высказывается мнение, что изменения функционального состояния материнского организма во время беременности, обусловленные инфекционными заболеваниями, приемом лекарственных препаратов, могут негативно влиять на развитие иммунной системы потомства [7,8]. Особый интерес представляют исследования последствий нарушений в иммунной системе матери в ранние сроки беременности до начала формирования органов иммунной системы плода, на развитие иммунной системы потомства в разные сроки постнатального развития.

Целью настоящего исследования было изучение морфофункционального состояния тимуса и селезенки потомства мышей, подвергшихся однократному им-

мунонестимулирующему воздействию панТ-клеточным митогеном конканавалином А (КонА) на ранних сроках беременности.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на мышах С57В1/6 в осенне-зимний период. Беременным самкам на 7ые сут. после оплодотворения однократно внутривенно в дозе 5 мг/кг вводили КонА в качестве активатора иммунной системы. Срок введения КонА был выбран с учетом особенностей эмбрионального развития органов иммунной системы. Формирование зачатков тимуса и селезенки происходит на 11сут эмбрионального развития [5]. Таким образом, выбранный срок введения КонА исключал возможность непосредственного воздействия на формирующиеся органы иммунной системы. Объектом исследования было потомство мужского пола (опытная группа, n=8). В качестве контрольной группы использовали самцов мышей (n=7), родившихся от интактных самок. Мышей выводили из эксперимента через 17 сут. после рождения, то

есть после перехода на самостоятельное вскармливание, передозировкой диэтилового эфира. Эксперимент проведен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977г. На проведение эксперимента получено разрешение этического комитета НИИ морфологии человека РАМН. Проводили гистологическое исследование препаратов селезенки и тимуса, окрашенных гематоксилином и эозином, методом световой микроскопии и компьютерной морфометрии с помощью программы "ImageScope" ("Leica Microsystems GmbH", Австрия). Методом компьютерной морфометрии в гистологических препаратах тимуса определяли соотношение коркового и мозгового вещества, ширину субкапсулярного слоя, количество тимических телец в мм² площади мозгового вещества, стадию их развития по О.В. Зайратьянцу [1] и количество клеток в составе телец. В гистологических препаратах селезенки изучали соотношение белой и красной пульпы, строение лимфатических узелков селезенки, ширину маргинальной зоны, количество лейкоцитов в ней, количество гемопозитических мононуклеарных клеток в мм² площади среза красной пульпы. Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 7.0 ("Statsoft", США). Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью критериев Стьюдента, Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При гистологическом исследовании тимус мышей контрольной группы был представлен двумя крупными долями, снаружи покрыт соединительнотканной капсулой. Субкапсулярный слой был широким (табл.1). Коровое вещество в долях было хорошо развито и представлено плотно лежащими лимфоцитами (табл.1). В корковом веществе встречались митотически делящиеся клетки. Граница между мозговым и корковым веществом была четкой. В мозговом веществе обнаруживалось большое количество

лимфоцитов (табл.1), встречались небольшого размера тимические тельца, как правило состоящие из 3-4 ретикулоэпителиоцитов (табл.1). Большинство тимических телец имели первую и вторую стадии развития (по $42,11 \pm 4,08\%$ каждая), то есть представляли собой скопления ретикулоэпителиоцитов с повышенной оксифилией цитоплазмы и накоплением в ней кератина. Тельца третьей и четвертой стадий развития с образованием полости и некрозом центральной части составляли $7,89 \pm 0,75\%$ и $7,89 \pm 0,72\%$, соответственно.

Тимус мышей опытной группы также был представлен двумя долями. Относительная масса тимуса соответствовала значениям контрольной группы. Коровое вещество также было хорошо развито и представлено плотно лежащими лимфоцитами (табл.1). Ширина субкапсулярного слоя статистически значимо не отличалась от значений контрольной группы (табл.1). Граница между корковым и мозговым веществом была четкой. Количество лимфоцитов в мозговом веществе было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе ($p = 0,002$). В мозговом веществе обнаруживалось большее, чем в контрольной группе, количество тимических телец ($p = 0,019$) (табл.1). Также было повышено и количество клеток в их составе ($p = 0,037$) (табл.1). Наблюдались отличия в соотношениях стадий развития тимических телец. Процентное содержание телец первой стадии не отличалось от значений контрольной группы и составляло в среднем $40,43 \pm 3,58\%$, а количество телец второй стадии развития повысилось до $55,32 \pm 4,02\%$. Тельца третьей и четвертой стадии составляли соответственно по $2,12 \pm 0,22$ и $2,13 \pm 0,25\%$.

Селезенка мышей контрольной группы имела типичное строение. Белая пульпа селезенки была умеренно развита и представлена лимфатическими узелками, часть которых лежала изолированно, а часть сливалась, образуя крупные скопления лимфоидных клеток (табл. 1). Герминативные центры в лимфатических узелках не были сформированы. В некоторых

Таблица 1
Изменения морфометрических показателей тимуса и селезенки потомства мышей C57Bl/6 после однократного введения беременным самкам Кон А, ($M \pm m$)

Морфометрические показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Тимус		
Доля коркового вещества, %	73,31±3,68	77,34±3,41
Ширина субкапсулярного слоя, мкм	58,48±4,47	53,01±3,58
Кол-во тимических телец/мм ² среза мозгового вещества	10,27±0,53	12,25±0,68*
Кол-во клеток в тимическом тельце	3,39±0,18	4,00±0,21*
Кол-во лимфоцитов в мм ² среза мозгового вещества	22180,0±818,0	17440,0±668,0*
Селезенка		
Доля белой пульпы, %	26,6±6,83	19,6±4,02
Площадь среза лимфатических узелков селезенки, мкм ²	150200,00±34502,39	96486,67±22464,55
Ширина маргинальной зоны, мкм	60,72±3,51	45,55±6,35*
Кол-во клеток в мм ² маргинальной зоны	21375,00±781,21	29652,50±868,99*
Кол-во клеток в мм ² красной пульпы	24175,00±803,29	27275,00±1076,16*
Кол-во мегакариоцитов в мм ² красной пульпы	16,00±2,48	25,50±3,26*

* – статистически значимые отличия от контрольной группы.

лимфатических узелках начинала формироваться периартериальная зона. Лимфатические узелки имели хорошо выраженную маргинальную зону (табл.1). Количество клеток в мм² маргинальной зоны было меньше, чем в красной пульпе, которая была обильно заселена клетками (табл.1). Встречались эритроциты, лимфоциты, нейтрофилы, а также большое количество эритро- и миелобластов. В красной пульпе находилось большое количество мегакариоцитов (табл. 1).

Селезенка мышей опытной группы по гистологическому строению соответствовала селезенке мышей контрольной группы. Доля белой пульпы была меньше, но статистически значимо не отличалась от значений контрольной группы (табл.1). Белая пульпа была представлена лимфатическими узелками, часть которых, также как и в контрольной группе, лежала изолированно, а часть сливалась, образуя крупные скопления. Размеры лимфатических узелков были меньше, чем в контрольной группе (табл.1). Периартериальная, герминативная и мантийная зоны в них не различались. Ширина маргинальной зоны была статистически значимо меньшей, чем в контрольной группе

($p=0,0064$), но количество клеток в ней превышало значения контрольной группы ($p=0,0043$) (табл. 1). Общее количество клеток в мм² среза красной пульпы, а также количество мегакариоцитов в ней также статистически значимо превышало значения контрольной группы (табл.1). В красной пульпе преобладали клетки лимфоцитарного ряда, среди них встречалось большое количество бластов.

В настоящем исследовании воздействие на иммунную систему матери заключалось в обусловленной Кон А активации лимфоцитов и секреции ими цитокинов – фактора некроза опухоли- α , интерлейкина (ИЛ)-2 и интерферона- γ , в последующем – ИЛ-4 и ИЛ-10 [6]. Активация клеточного звена иммунитета приводит к развитию цитокинового гепатита [2]. При выборе дозы КонА мы руководствовались собственными данными предварительных экспериментов, установив дозу, при которой отмечается повышение синтеза цитокинов, но гепатит у беременной самки не развивается. Полученные данные показали, что однократная кратковременная стимуляция иммунной системы матери на ранних сроках беременности приводит к длительно наблюдаемому изменению

морфофункциональных показателей тимуса потомства. Изменения были связаны с уменьшением количества лимфоцитов в мозговом веществе, где в основном находятся зрелые лимфоциты, а также с увеличением гибели ретикулоэпителия, принимающего непосредственное участие в процессах дифференцировки лимфоцитов [3]. Уменьшение количества лимфоцитов в корковом веществе могло быть связано либо с замедлением процессов их созревания, либо с ускоренной миграцией в периферические органы иммунной системы. Увеличение гибели ретикулоэпителиоцитов за счет увеличения количества как тимических телец и клеток в их составе, так и увеличения телец в более ранних стадиях развития, возможно, было одной из причин замедления созревания лимфоцитов.

Выброс цитокинов, обусловленный введением Кон А в ранние сроки беременности до начала формирования органов иммунной системы плода, приводил к изменению постнатального развития селезенки, что проявлялось отставанием развития лимфатических узелков – меньшие размеры, несформированность периартериальной (Т-зависимой) и маргинальной (кооперативной) зон. Невыраженность периартериальных зон указывала, что наиболее вероятной причиной уменьшения количества лимфоцитов в мозговом веществе тимуса было не усиление миграции, а снижение темпов дифференцировки. Селезенка мышей является не только периферическим органом иммунной защиты, но и органом кроветворения, в котором, в отличие от человека, происходит дифференцировка не только клеток лимфоидного, но и гранулоцитарного и эритроцитарного ростков [4]. Гемопоэтическая функция селезенки продолжается и на ранних этапах постнатального развития особи. Проведенное исследование показало, что в селезенке мышей опытной группы в возрасте 17 сут отмечались и более интенсивные процессы кроветворения в красной пульпе.

Выводы

1. Пренатальное воздействие Т-клеточного митогена конканавалина А на ранних сроках беременности до начала формирования органов иммунной системы у плода приводит к изменению морфофункционального состояния тимуса и селезенки потомства в постнатальном периоде развития.

2. В тимусе происходит увеличение гибели ретикулоэпителия и уменьшение количества лимфоцитов в мозговом веществе.

3. Морфогенетические процессы превращения селезенки из органа кроветворения в орган иммунной защиты у потомства происходят более медленными темпами, что проявляется отставанием формирования лимфатических узелков и более выраженными процессами гемопоэза.

Литература

1. Болезни вилочковой железы / В.П. Харченко [и др.]. – М.: Триада-Х, 1998. – 231 с.
2. Динамика морфофункциональных изменений органов иммунной системы мышей Balb/c при экспериментальном гепатите / С.С. Обернихин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, №4. – С. 451-454.
3. Ярилин А.А. Цитокины в тимусе. Биологическая активность и функции цитокинов в тимусе / А. Ярилин // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2, №2. – С. 3-11.
4. Cell death and phagocytosis of haematopoietic elements at the onset of haematopoiesis in the mouse spleen: an ultrastructural study / K. Sasaki [et al.] // J. Anat. – 1993. – Vol. 183. – P. 113-120.
5. Gordon J. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis / J. Gordon, N. Manley // Development. – 2011. – Vol. 138. – P. 3865-3878.
6. Involvement of IL-10, an anti-inflammatory cytokine in murine liver injury induced by Concanavalin A / M. Kato [et al.] // Hepatol. Res. – 2001. – Vol. 20, №2. – P. 232-243.

7. Maternal immune status in pregnancy is related to offspring's immune responses and atopy risk / G. Herberth [et al.] // *Allergy*. – 2011. – Vol. 66, №8. – P. 1065-1074.
8. Prenatal programming of the innate immune response following in utero exposure to inflammation: a sexually dimorphic process? / N. Hodyl [et al.] // *Expert Review of clinical immunology*. – 2011. – Vol. 7, №5. – P. 579-592.

MORPHOLOGY OF IMMUNE SYSTEM OF OFFSPRING AFTER STIMULATION OF MATERNAL IMMUNE SYSTEM IN EARLY PREGNANCY

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin

Stimulation of maternal immune system in early pregnancy with Concanavalin A, a T-cell mitogen, prior to formation of fetal immune system impairs development of the offspring's spleen and thymus. Our findings demonstrate that short-term exposure of pregnant murine dams to Concanavalin A, leads to retardation of postnatal development of offspring's spleen and reduction of lymphocytes count in thymus medulla and accelerated formation of thymic corpuscles.

Keywords: thymus, spleen, prenatal exposure, concanavalin A.

Яглова Н.В. – д-р мед. наук, зав. лабораторией развития эндокринной системы НИИМЧ РАМН.

E-mail: yaglova@mail.ru.

Обернихин С.С. – канд. мед. наук, ст. научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии НИИМЧ РАМН.

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Тел./факс: (499) 120-80-65.

E-mail: morfolhum@mail.ru.