

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Симонова Е.Ю., Косырева А.М., 2014
УДК 612.017.1+612.112.94]:612.621.5

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНОВ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ
ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У САМОК КРЫС ВИСТАР
В РАЗНЫЕ ФАЗЫ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА**

Е.Ю. Симонова, А.М. Косырева

МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва
ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, г. Москва

Выявлены различия морфофункционального состояния иммунной системы у самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла. По сравнению с фазой проэструса у самок в фазе диэструса выше показатели объемной плотности коркового вещества тимуса и объемной плотности белой пульпы и маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки; ниже показатели ширины субкапсулярной зоны тимуса и индекса стимуляции гранулоцитов периферической крови. По показателям абсолютного и относительного числа Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических, активированных и регуляторных Т-клеток в периферической крови различий между самками в фазах проэструса и диэструса не обнаружено.

Ключевые слова: эстральный цикл, крысы Вистар, иммунная система, субпопуляционный состав лимфоцитов, фагоцитарная активность гранулоцитов.

По данным экспериментальных исследований морфофункциональное состояние иммунной системы у самок циклически изменяется в зависимости от фазы эстрального цикла [2, 5]. «Эстрогеновый статус» является одним из факторов, модулирующих выраженность иммунного ответа [2]. По сравнению с другими фазами эстрального цикла фаза проэструса, при которой наблюдается максимальный уровень эстрадиола в сыворотке крови (100-200 пг/мл у крыс), характеризуется наиболее выраженной реакцией иммунной системы на антигенные воздействия [2, 11].

Немногочисленными исследованиями показано, что половые гормоны играют важную роль в регулировании процессов пролиферации, дифференцировки, миграции и активации иммунокомпетентных клеток [6, 10]. В литературе представлены данные о субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у женщин в

зависимости от фазы менструального цикла. По сравнению с лютеиновой фазой овариального цикла в фолликулярной фазе наблюдается увеличение числа Т-лимфоцитов и Т-хелперов в крови [8]. Данные о гистофизиологических особенностях органов иммунной системы и субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови у самок крыс и других грызунов в разные фазы эстрального цикла в литературе отсутствуют, что затрудняет анализ экспериментальных данных о влиянии женских половых гормонов на функционирование иммунной системы в физиологических условиях и при различных патологических процессах.

Целью исследования было изучение морфофункционального состояния органов иммунной системы и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла.

Материалы и методы

В работе использовали половозрелых самок крыс Вистар с устойчивым 4-дневным эстральным циклом массой 250-300 г (питомник «Столбовая»). При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Крысы содержались в условиях вивария при температуре 20-22°C и относительной влажности 60-70% по 5 особей в клетке и имели свободный доступ к пище и воде.

Во влагиалищных мазках крыс оценивали соотношение различных клеточных элементов и по кольпоцитогамме определяли фазу эстрального цикла. Отбирали самок в фазе проэструса (высокий уровень эстрогенов в сыворотке крови) и в фазе диэструса (низкий уровень эстрогенов в сыворотке крови). Забор крови из хвостовой вены проводили под эфирным наркозом. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (50 ЕД/мл). С помощью гематологического анализатора Celltac alpha MEK-6400 («Nihon Kohden») подсчитывали абсолютное количество лимфоцитов в крови. Методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter») определяли субпопуляционный состав лимфоцитов и фагоцитарную активность гранулоцитов периферической крови.

Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций лимфоцитов использовали следующие антитела («Bioscience»): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов); anti-Rat CD4 (маркер Т-хелперов); anti-Rat CD8a (маркер цитотоксических Т-клеток); anti-Rat CD45R (маркер В-лимфоцитов); anti-Rat CD25 (маркер активированных Т-клеток); anti-Mouse/Rat Foxp3 (маркер регуляторных Т-клеток). Проводили подсчет абсолютного и относительного количества лимфоцитов различных субпопуляций и иммунорегуляторного индекса (соотношения CD4/CD8).

Для оценки фагоцитарной активности гранулоцитов использовали набор FagoFlowEx Kit («EXBIO Diagnostics»). Образцом отрицательного контроля слу-

жила цельная гепаринизированная кровь; в качестве стимулированного образца использовали кровь с добавлением стандартизованной суспензии *Escherichia coli*. В каждый из образцов добавляли дигидрорадамин 123 (DHR123) и регистрировали флуоресценцию родамина 123, который образуется при окислении DHR123 в процессе респираторного взрыва в активированных гранулоцитах. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) в контрольном и стимулированном образцах. Вычисляли индекс стимуляции – отношение СИФ активированных гранулоцитов стимулированного образца к СИФ нестимулированных гранулоцитов образца отрицательного контроля.

Животных выводили из эксперимента с помощью передозировки диэтилового эфира и проводили забор тимуса и селезенки для гистологического исследования. Материал фиксировали в растворе Буэна, заливали в парафин, изготавливали гистологические срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином. На гистологических препаратах под световым микроскопом оценивали объемную плотность структурно-функциональных зон тимуса и селезенки методом точечного счета с помощью окулярной сетки Г.Г. Автандилова [1]. Ширину субкапсулярной зоны тимуса измеряли в микрометрах при ув. 400.

Полученные данные подвергали статистической обработке. Достоверность различий между показателями определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни в программе Statistica 7.0. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При морфологическом и морфометрическом исследовании органов иммунной системы самок крыс Вистар было обнаружено, что в фазе диэструса увеличена объемная плотность коркового вещества и снижена ширина субкапсулярной зоны тимуса, а также увеличена объемная плотность белой пульпы и маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки по сравнению с фазой проэструса (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические показатели тимуса и селезенки самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла

Показатель		Фаза эстрального цикла	
		Прозэструс	Диэструс
Тимус	Корковое вещество, %	49,64±0,97	64,96±1,57*
	Субкапсулярная зона, мкм	34,55±0,59	24,02±0,55*
Селезенка	ПАЛМ-зона, %	28,24±0,69	40,05±2,31*
	Лимфоидные узелки, %	15,45±0,43	29,20±2,53*
	Белая пульпа, %	43,69±0,81	69,25±3,38*
	Светлые центры, %	22,40±0,84	20,74±1,42
	Маргинальная зона, %	44,86±1,02	31,40±1,71*

* – различия статистически значимы между группами

Различия морфофункционального состояния иммунной системы у самок обусловлены, вероятно, различным уровнем продукции эстрадиола и прогестерона в разных фазах эстрального цикла. Расширение субкапсулярной зоны тимуса у самок в фазе проэструса может быть связано с повышенным уровнем прогестерона в сыворотке крови по сравнению с фазой диэструса. Известно, что прогестерон обладает выраженным иммуномодулирующим действием [10]. По данным литературы прогестерон может с высокой аффинностью связываться с глюкокортикоидными рецепторами, которые экспрессируются лимфоцитами субкапсулярной зоны тимуса [7]. McMurry и соавт. [13] изучали влияние половых гормонов на процесс апоптотической гибели тимоцитов, индуцируемой глюкокортикоидами. Авторами было показано, что прогестерон подавляет спонтанную гибель Т-лимфоцитов и предотвращает апоптоз тимоцитов, индуцируемый глюкокортикоидами. Таким образом, антиапоптотические эффекты прогестерона, содержание которого в сыворотке крови повышается у самок в фазе проэструса, могут оказывать влияние на развитие Т-лимфоцитов тимуса, в связи с чем в этой фазе эстрального цикла, по-видимому, и наблюдается увеличение ширины субкапсулярной зоны.

Снижение объемной плотности коркового вещества тимуса, а также объемной плотности лимфоидных узелков и ПАЛМ-

зоны селезенки у самок в фазе проэструса может быть связано с повышенным содержанием эстрадиола в сыворотке крови по сравнению с фазой диэструса. Известно, что эстрогены подавляют пролиферацию тимоцитов, но ускоряют их дифференцировку и миграцию, а также повышают проницаемость сосудов тимуса [3, 6]. Этим обусловлено, вероятно, сужение коркового вещества тимуса у самок в фазе проэструса. Широко известно, что эстрогены активируют иммунную систему и способствуют интенсивной миграции лимфоцитов в барьерные органы [10, 12], что может приводить к снижению объемной плотности белой пульпы и расширению маргинальной зоны лимфоидных узелков селезенки у самок в фазе проэструса по сравнению с фазой диэструса.

Таким образом, циклические изменения морфофункционального состояния иммунной системы у самок крыс Вистар определяется уровнем эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови и фазой эстрального цикла.

При иммунофенотипическом анализе основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови у самок в разных фазах эстрального цикла не было выявлено статистически значимых различий по показателям абсолютного и относительного количества Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических, активированных и регуляторных Т-клеток, а также иммунорегуляторного индекса (табл. 2).

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла

Показатель		Фаза эстрального цикла	
		Прозэструс	Диэструс
Лимфоциты, млн/мл		9,33±1,04	11,61±1,04
Т-лимфоциты	Отн. число, %	55,66±3,20	63,63±2,43
	Абс. число, млн/мл	5,13±0,59	6,96±0,85
Т-хелперы	Отн. число, %	29,47±1,38	29,07±2,36
	Абс. число, млн/мл	1,46±0,10	2,10±0,57
Цитотоксические Т-клетки	Отн. число, %	27,14±3,46	33,91±4,42
	Абс. число, млн/мл	1,47±0,31	2,34±0,54
В-лимфоциты	Отн. число, %	30,36±2,39	24,84±2,09
	Абс. число, млн/мл	2,79±0,35	3,07±0,34
Активированные Т-клетки	Отн. число, %	8,24±0,55	7,31±0,76
	Абс. число, млн/мл	0,12±0,01	0,15±0,04
Регуляторные Т-клетки	Отн. число, %	3,50±0,30	4,17±0,39
	Абс. число, млн/мл	0,05±0,01	0,08±0,02
Иммунорегуляторный индекс, усл. ед.		1,27±0,22	1,09±0,20
Индекс стимуляции, усл. ед.		5,35±0,73	3,14±0,40*

* – различия статистически значимы между группами

Влияние женских половых гормонов на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови изучено у человека и приматов, тогда как данные исследований на крысах и других грызунах в литературе отсутствуют. Показано, что количество Т-лимфоцитов и Т-хелперов увеличено у женщин в фолликулярной фазе овариального цикла по сравнению с лютеиновой фазой, а количество В-лимфоцитов практически не изменяется в разные фазы цикла [8]. По сравнению с женщинами репродуктивного возраста у женщин в постменопаузе наблюдается снижение уровня половых гормонов; при этом уменьшается количество Т-хелперов и В-лимфоцитов в периферической крови, но возрастает количество цитотоксических Т-клеток [8].

Половые гормоны играют важную роль в регуляции активности лимфоцитов. По данным Кагрузоглу и соавт. [9], Т-лимфоциты мышей, которым вводили наиболее активный эстроген 17β-эстрадиол, характеризуются повышенной экспрессией транскрипционного фактора T-bet по сравнению с контрольной группой. Увеличение экспрессии T-bet приводит к усилению продукции ИНФ-γ Т-

лимфоцитами и поляризации иммунного ответа по Tх1-типу [9].

Нами, однако, не было выявлено различий субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в разные фазы эстрального цикла, хотя известно, что фаза диэструса характеризуется низким уровнем эстрогенов в сыворотке крови, а в фазе проэструса содержание эстрогенов достигает максимального уровня. Отсутствие значимых различий по показателям абсолютного и относительного количества лимфоцитов основных субпопуляций может быть связано с различным уровнем прогестерона у самок в разных фазах эстрального цикла. Данные о влиянии этого гормона на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови немногочисленны. Известно, что прогестерон оказывает выраженное иммуномодулирующее влияние, поляризуя иммунный ответ по Tх2-типу [10]. Pavia и соавт. [14] показали, что прогестерон *in vitro* подавляет функциональную активность Т-лимфоцитов. Кроме того, выявлено, что при повышении уровня прогестерона в сыворотке крови у женщин наблюдается снижение количества развивающихся В-лимфоци-

тов в костном мозге [10]. Известно, что фаза проэструса характеризуется высоким уровнем прогестерона в сыворотке крови. Этот гормон может оказывать влияние на субпопуляционный состав лимфоцитов и снижать абсолютное и относительное количество Т- и В-клеток в периферической крови.

Индекс стимуляции гранулоцитов периферической крови, отражающий их фагоцитарную активность, был статистически значимо выше у самок в фазе проэструса по сравнению с фазой диэструса (табл. 2). Известно, что эстрогены оказывают влияние на функционирование нейтрофилов периферической крови. Bekesi и соавт. [15] выявили, что эстрадиол снижает продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и уменьшает интенсивность респираторного взрыва. Однако другие исследователи показали, что эстрогены не снижают активность респираторного взрыва в нейтрофилах [4]. Кроме того, известно, что фаза проэструса, при которой наблюдается максимальный уровень эстрогенов в сыворотке крови, характеризуется наиболее интенсивной реакцией иммунной системы на антигенные воздействия по сравнению с другими фазами эстрального цикла [10], что может обуславливать усиление фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови и, соответственно, индекса их стимуляции у самок в фазе проэструса.

Выводы

1. Выявлены различия морфофункционального состояния органов иммунной системы у самок крыс Вистар в разные фазы эстрального цикла. По сравнению с фазой проэструса у самок в фазе диэструса в тимусе увеличена объемная плотность коркового вещества и снижен показатель ширины субкапсулярной зоны, в селезенке увеличена объемная плотность белой пульпы и маргинальной зоны лимфоидных узелков.

2. Статистически значимых различий по показателям абсолютного и относительного числа Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических, активированных и регуляторных Т-клеток в перифе-

рической крови у самок в фазах проэструса и диэструса не обнаружено.

3. Выявлены различия фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови у самок в разные фазы эстрального цикла. По сравнению с фазой диэструса у самок в фазе проэструса выше индекс стимуляции гранулоцитов, отражающий их фагоцитарную активность.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Angele M.K. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches / M.K. Angele, M.C. Frantz, I.H. Chaudry // *Clinics*. – 2006. – Vol. 61, №5. – P. 479-488.
3. Changes in the blood thymus barrier of adult rats after estradiol treatment / A. Martin [et al.] // *Immunobiol.* – 1995. – Vol. 192. – P. 231-248.
4. Chiang K. Estrogen, neutrophils and oxidation / K. Chiang, S. Parthasarathy, N. Santanam // *Life Sci.* – 2004. – Vol. 75, №20. – P. 2425-2438.
5. Different immune responses to abdominal surgery in men and women / M.W. Wichmann [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2003. – Vol. 387. – P. 397-401.
6. Differential effects of male and female gonadal hormones on the intrathymic T cell maturation / B. Pejčić-Karapetrović [et al.] // *Dev. Immunol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 305-317.
7. Evaluation of steroid hormone receptor protein expression in intact cells using flow cytometry / C.L. Butts [et al.] // *Nucl. Recept. Signal.* – 2007. – Vol. 5. – P. 7.
8. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women / S. Lee [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185. – P. 756-762.
9. IFN-gamma-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12 / E. Karpuzoglu [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2007. – Vol. 44, №7. – P. 1819-1825.

10. Klein S.L. Sex Hormones and Immunity to Infection / S.L. Klein, C.W. Roberts. – Heidelberg (Germany): Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. – P. 1-319.
11. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains / B.F. Bebo [et al.] // J. Immunol. – 2001. – Vol. 166, № 3. – P. 2080-2089.
12. Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors / S. Hao [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2007. – Vol. 15. – P. 1765-1775.
13. Progesterone inhibits glucocorticoid-induced murine thymocyte apoptosis / R.W. McMurray [et al.] // Int. J. Immunopharmacol. – 2000. – Vol. 22, № 11. – P. 955-965.
14. Suppression of murine allogeneic cell interactions by sex hormones / C. Pavia [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 1979. – Vol. 1, № 1. – P. 33-38.
15. The effect of estrogens on superoxide anion generation by human neutrophil granulocytes: possible consequences of the antioxidant defense / G. Bekesi [et al.] // Gynecol. Endocrinol. – 2007. – Vol. 2. – P. 1-4.

THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE ORGANS OF IMMUNE SYSTEM AND LYMPHOCYTE SUBSETS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF FEMALE WISTAR RATS IN DIFFERENT PHASES OF THE ESTROUS CYCLE

E.Yu. Simonova, A.M. Kosyreva

Differences in the morphofunctional state of the immune system of female Wistar rats in different phases of the estrous cycle are revealed. In the phase of diestrus the indices of cortex volume fraction of thymus and volume fraction of white pulp and marginal zone of lymphoid follicles of spleen are higher; the indices of subcapsular layer width of thymus and index of stimulation of granulocytes in the peripheral blood are lower as compared with the phase of proestrus. Differences in the absolute count and the percentage of T and B lymphocytes, T helpers, cytotoxic, activated and regulatory T cells in the peripheral blood of female rats in the phases of proestrus and diestrus aren't revealed.

Keywords: *estrous cycle, Wistar rats, immune system, lymphocyte subsets, phagocytic activity of granulocytes.*

Симонова Евгения Юрьевна – ассист. кафедры клеточной биологии и гистологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.
E-mail: evgenisimonova@mail.ru.

Косырева Анна Михайловна – канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН.
E-mail: babushka84@list.ru.