

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 612.438:612.398.192:612.66

СОКОЛ
Андрей Валентинович

**ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ
НЕЙРОПЕПТИДОВ В ТИМУСЕ ЧЕЛОВЕКА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Минск 2013

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Научный руководитель: **Руденок Василий Васильевич**, доктор медицинских наук, профессор, проректор по международным связям учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Арчакова Людмила Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник государственного научного учреждения «Институт физиологии НАН Беларуси»

Алексеев Сергей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Защита состоится 20 июня 2013 года в 14.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.03 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, тел. (8-017) 272-55-98. E-mail: bsmu@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «17» мая 2013 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



Н.А. Трушель

ВВЕДЕНИЕ

Исследование возрастной динамики экспрессии нейропептидов в тимусе человека в онтогенезе является одной из приоритетных проблем фундаментальной и клинической медицины. С одной стороны, ее значение определяется ключевой ролью тимуса в поддержании иммунологического гомеостаза, с другой, – универсальными модулирующими свойствами нейропептидов в регуляции тимопоэза. Более того, локализация рецепторов к одним и тем же нейропептидам в нейронах, эндокринных клетках и лимфоцитах доказывает существование единого биохимического механизма лиганд-рецепторных взаимодействий между иммунной, нервной и эндокринной системами [Полякова В.О., 2006; Lühder F., 2009; Mignini F., 2011].

Обладая рядом признаков характерных для нейротрансмиттеров, нейропептиды отличаются молекулярной массой, механизмами синтеза, депонирования, высвобождения, расщепления, а также функциями и длительностью физиологических эффектов в органах-мишенях [Руденок В.В., 2002; Zigmond R., 1999; Silva A., 2008]. Так, нейропептид Y (НПУ) является ко-трансммиттером норадреналина и, наряду с сосудосуживающим эффектом, регулирует тимопоэз, а также выполняет иммуносупрессорные функции. Вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП) и кальцитонин-ген родственный пептид (КГРП), осуществляя ассоциированные эффекты с ацетилхолином, являются вазодилататорами и обладают модулирующими функциями в иммунной системе, контролируя рост и дифференцировку Т-лимфоцитов, продукцию антител, цитокинов, а также влияют на апоптоз клеточных популяций тимуса [Mignini F., 2003; Delgado M., 2004; Pons J., 2004; Yu X.J., 2010].

Между тем, подавляющее большинство исследований, выполненных в условиях *in vivo* и *in vitro*, касается выявления экспрессии и функций нейропептидов в первичных и вторичных лимфоидных органах млекопитающих животных и птиц [Dimitrijević M., 2005; Silva A., 2011]. Данные об экспрессии трансмиттеров пептидной природы в тимусе человека в норме и патологии фрагментарны, а порой и противоречивы.

Таким образом, исследование возрастных изменений экспрессии нейропептидов в тимусе человека представляет безусловный теоретический и практический интерес, поскольку дает возможность оценить уровень зрелости и/или функциональной активности клеточных структур тимуса в онтогенезе, что, в свою очередь, позволит решить ряд прикладных проблем современной иммунологии и медицины в области патоморфологической диагностики, а также рациональной фармакотерапии инфекционных, аутоиммунных, онкологических заболеваний у детей и взрослого населения.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь с крупными научными программами (проектами) и темами. Тема диссертационной работы соответствует перечню приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19. 04. 2010 г. № 585), п. 4 «Лечебные, диагностические, профилактические и реабилитационные технологии, клеточные и молекулярно-биологические технологии в медицине, аппараты и приборы медицинского назначения», п. 4.1 «Самоорганизация живых систем, закономерности течения патологических процессов, коррекция жизненно важных функций».

Диссертационное исследование выполнено по плану научно-исследовательских работ УО «Белорусский государственный медицинский университет» в рамках темы: «Видовые закономерности строения ряда органов разных систем в онтогенезе человека и животных в норме и под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды» (№ государственной регистрации 2008355, срок выполнения – 2008–2012 гг.) и ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» (№ государственной регистрации 20111041, срок выполнения – 2011–2013 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования – выявить изменения экспрессии нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе человека в онтогенезе.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить иммунореактивность к нейропептиду Y, вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе плодов, новорожденных и взрослого человека.

2. Определить различия между уровнями иммунореактивности к нейропептиду Y, вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду в клеточных популяциях, тельцах Гассалья и нервных волокнах тимуса плодов, новорожденных и взрослого человека.

3. Установить возрастные изменения и закономерности экспрессии нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе человека в онтогенезе.

Объект исследования: аутопсийный материал тимуса плодов, новорожденных детей и взрослого человека.

Предмет исследования: экспрессия нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида.

Выбор объекта и предмета исследования обусловлен недостаточным количеством исследований возрастной динамики экспрессии НPY, ВИП и КГРП в тимусе человека.

Положения, выносимые на защиту

1. В пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза человека тимус характеризуется нейропептидной гетерогенностью, выражающейся в экспрессии его клеточными популяциями, тельцами Гассалья и нервными волокнами нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида.

2. Тимус плода, новорожденного и взрослого человека отличаются между собой уровнями иммунореактивности нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в клеточных популяциях субкапсулярной, внутренней кортикальной и медуллярной зон, тельцах Гассалья и нервных волокнах. Вариабельность экспрессии нейропептидов может отражать различное участие нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в процессах тимопоэза, а также в обеспечении нервных и гуморальных механизмов регуляции функций органа в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза человека.

3. Экспрессия нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе человека в онтогенезе носит гетерохронный характер. Максимальная иммунореактивность нейропептида Y выявляется в клеточных популяциях и тельцах Гассалья тимуса новорожденных, нервных волокнах новорожденных и взрослых; вазоактивного интестинального полипептида – в клетках тимуса плодов, нервных волокнах тимуса новорожденных и тельцах Гассалья тимуса взрослых; кальцитонин ген-родственного пептида – в клетках и нервных волокнах тимуса плодов, тимических тельцах взрослых.

4. Высокий уровень иммунореактивности к нейропептиду Y, вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду в клеточных популяциях является характерным признаком тимуса плода и новорожденного ребенка. Экспрессия нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в нервных волокнах и повышение иммунореактивности к вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду в тельцах Гассалья в тимусе

взрослого человека свидетельствует о сохранении иммунной и эндокринной функций тимуса на фоне уменьшения его паренхимы вследствие возрастной инволюции.

Личный вклад соискателя. Совместно с научным руководителем обоснована тема исследования, сформулированы цель и задачи. Соискателем лично проведен обзор литературы, набор и фиксация биологического материала, изготовление, оценка и описание гистологических и иммуногистохимических препаратов, проведена статистическая обработка цифрового материала и анализ результатов. Выводы, положения, выносимые на защиту, и практические рекомендации обсуждены и сформулированы совместно с научным руководителем. Основные результаты работы представлены в 17 научных публикациях, в которых личный вклад соискателя составляет 85%.

Автор выражает благодарность за консультативную помощь в получении биологического материала и проведении исследований доценту Рогову Ю.И. (ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»), доценту Неровне А.М. (УО «Белорусский государственный медицинский университет»), Карапетьяну Г.М. (УО «Белорусский государственный медицинский университет»), профессору Кюнелю В. (Университет г. Любека, ФРГ), профессору Хичевскому Л. (Медицинский университет г. Белостока, РП).

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований были представлены для обсуждения на международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых БГМУ «Актуальные проблемы современной медицины» (Минск, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011); международной конференции «Экспериментальные и клинические аспекты морфологии» (Гродно, 2003); международной конференции «Текущие достижения и новые тенденции в медицинских науках» (Белосток, 2004); международной научной конференции, посвященной 100-летию Петра Герке «Фундаментальные проблемы современной морфологии» (Минск, 2004); 99-м конгрессе немецкого анатомического общества (Вена, 2004); 21-й рабочей конференции немецкого анатомического общества (Вюрцбург, 2004); 100-м конгрессе немецкого анатомического общества (Лейпциг, 2005); 101-м конгрессе немецкого анатомического общества (Фрайбург, 2006); 2-й международной научной конференции студентов-медиков и молодых докторов (Белосток, 2006); международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию Белорусского государственного медицинского университета (Минск, 2006); 5-м международном конгрессе иммунопатологии и аллергологии (Москва,

2007); 14-м международном конгрессе по иммунологии (Кобе, 2010); международной конференции морфологов, посвященной 110-летию академика НАН Беларуси Голуба Д.М. (Минск, 2011); международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию Белорусского государственного медицинского университета (Минск, 2011); 6-м международном симпозиуме «Global Strategic Center for Radiation Health Risk Management» (Нагасаки, 2011).

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ. Из них в рецензируемых журналах – 7, в материалах конференций – 7; тезисов докладов – 3. Инструкция по применению – 1. Всего 50 страниц – 3,4 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, шести глав, заключения, библиографического списка, включающего 365 источников литературы (34 отечественных и 331 иностранных), списка публикаций соискателя (18), приложений (7). В работе содержится 5 таблиц, 42 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Иммуногистохимические исследования проведены на тимусе плодов, новорожденных и взрослых, причины смерти которых не были связаны с инфекционной, онкологической и аутоиммунной патологией. Аутопсийный материал был получен в УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» и Государственной службе медицинских судебных экспертиз г. Минска и Минской области в соответствии с законом Республики Беларусь № 55-3 от 12.11.2001 г. «О погребении и похоронном деле». Сроки от момента смерти до изъятия тимуса составляли не более 24 часов.

Объект исследования: аутопсийный материал 73 тимусов человека в возрасте от 24–27 недель до 45 лет. Материал для исследования был разделен на 3 возрастные группы: 1-я группа – тимусы плодов 24–27 недель, 2-я группа – тимусы новорожденных 1–4 суток, 3-я группа – тимусы взрослых 27–45 лет.

В работе использованы гистологический, непрямой иммуногистохимический, морфометрический и статистический методы исследования.

Основным методом, используемым в настоящем исследовании, является непрямой иммуногистохимический, который сочетает в себе

возможности трех широко используемых в медико-биологических исследованиях методов: гистологического, биохимического и иммунологического. Метод основан на применении первичных антител, специфичных к исследуемым антигенам. Антитела образуют с антигенами иммунные комплексы, которые обнаруживаются с помощью вторичных антител, связанных с флуорофорами или пероксидазно-антипероксидазным комплексом. Среди достоинств метода, в первую очередь, следует выделить высокую селективность к различным антигенным детерминантам, стойкость иммунных комплексов, простоту и надежность в выполнении, широкие возможности для светооптической и флуоресцентной визуализации продукта реакции, а также способность выявлять антигены со слабой экспрессией [Boenisch T., 2001].

В качестве первичных антител применялись антитела к нейропептиду Y, вазоактивному кишечинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду.

Фиксация материала проводилась в универсальном растворе для иммуногистохимических исследований: 2% растворе Замбони. После фиксации фрагменты тимуса последовательно промывались в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), 50% этиловом спирте, 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), 20% растворе сахарозы. Серийные срезы толщиной 8–10 мкм были приготовлены из замороженных в 0,9% физиологическом растворе фрагментов тимуса с помощью автоматического замораживающего микротомы фирмы «Leica» при температуре -22°C , смонтированы на покрытых желатином (2% раствор) предметных стеклах и высушены при комнатной температуре ($18-20^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут. После промывания в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 20 минут на них наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakoratts; X907 1:100). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. После удаления сыворотки срезы обрабатывались сыворотками, содержащими поликлональные антитела к нейропептидам: нейропептиду Y (Milab, B 48-100, 1:200), вазоактивному кишечинальному полипептиду (Affinity, VA 1285, 1:400) или кальцитонин ген-родственному пептиду (Peninsula, ИНС 6012, 1:200). Препараты помещались в инкубационную камеру на 24 часа. Дальнейшие этапы выполнения реакций зависели от применяемой разновидности непрямого иммуногистохимического метода. При использовании непрямого иммунофлуоресцентного метода срезы обрабатывались сывороткой, содержащей конъюгированные с флуорофором Cy3 (Cy3TM-GARlgG, 30254, Jackson) вторичные антитела в разведении 1:100, и помещались на 2 часа в темную увлажненную камеру. После удаления сыворотки и

двукратного промывания в фосфатном буфере (рН 7.4) срезы заключались в глицерин/фосфатный буфер (3:1). Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе Axiophot («Zeiss», Германия) с комбинациями фильтров для СуЗ индуцированной иммунофлуоресценции.

При использовании непрямого иммунопероксидазного метода на срезы микропипеткой наносилась козья сыворотка с вторичными антителами (GAR IgG, Dakopatts Z421) в разведении 1:100. Препараты помещались в инкубационную камеру на 12 часов при комнатной температуре (18–20°C). После удаления вторичных антител на срезы наносился раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный (ПАП) комплекс (Dakopatts Z113, разведение 1:100), и препараты помещались в камеру для инкубации на 12 часов при комнатной температуре (18–20°C). По истечении срока инкубации предметные стекла извлекались из инкубационной камеры и дважды по 10 минут промывались в кюветах с фосфатным буфером (рН 7.4) при комнатной температуре (18–20°C). Для выявления продукта реакции в качестве хромогена на срезы микропипеткой наносился 0,01% раствор диаминобензидина (Amerham) на 5–10 минут при комнатной температуре (18–20°C). Затем срезы промывались дистиллированной водой в кюветах в течение 10 минут при комнатной температуре (18–20°C) и заключались под покровные стекла с использованием акватекса (Merk). Оценка результатов исследования проводилась на светооптическом уровне при увеличении 400× с использованием универсального светооптического микроскопа. Продукт реакции в клетках ткани или нервных волокнах определялся в виде мелкодисперсных зерен коричневого цвета. Интенсивность реакции оценивалась как слабая, средняя и высокая.

Контроль иммуногистохимической реакции, тканевых антигенов, поликлональных антител, реагентов проводился в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

С целью гистологического контроля каждый 6-й или 11-й криостатный срез (в зависимости от размера образца ткани) окрашивался гематоксилином-эозином.

Морфометрические исследования и статистическая обработка полученных результатов проводились на анализаторе изображений «Bioscan-NT» в лаборатории информационно-компьютерных технологий НИЧ Белорусского государственного медицинского университета. Количество иммунореактивных (ИР) к нейропептиду Y, вазоактивному кишечинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду клеток, телец Гассалья и нервных волокон определялось в трех произвольно выбранных областях (субкапсулярная, внутренняя

кортикальная и медуллярная зоны тимуса) на каждом 5-м или 10-м срезе (в зависимости от размера образца биологического материала). В каждом случае анализировалось не менее 10 полей зрения при увеличении 400× [Автандилов Г.Г., 1990]. Определялся показатель экспрессии нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида, который представлял собой отношение демонстрирующих положительную иммуногистохимическую реакцию к нейропептидам клеточных структур к общему числу клеток, выраженный в процентах. Количество иммунореактивных к НПУ, ВИП и КГРП нервных волокон рассчитывалось на мм². Количество НПУ-, ВИП- и КГРП-иммунореактивных телец Гассалья выражалось в процентах.

Для статистической обработки полученных результатов применялся пакет прикладных программ «Statistica» (Version 10, Statsoft). Процедура статистической обработки проводилась в несколько этапов. Вначале рассчитывались математические параметры для не сгруппированных данных, позволяющие представить характер выборочного распределения: M – среднее арифметическое (как один из самых информативных признаков выборки), σ – стандартное отклонение (для корректного определения степени рассеянности данных) и m – ошибка среднего. Нормальность распределения экспериментальных данных подтверждалась критерием Шапиро–Уилка. Достоверность различий выборочных совокупностей проверялась с помощью критерия Стьюдента с уровнем статистической значимости $\alpha=0,05$, $\alpha=0,001$.

Результаты собственных исследований

Сравнительный анализ динамики иммунореактивности к нейропептиду Y, вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе в онтогенезе человека выявил однофазный характер их экспрессии. При этом, пик иммунореактивности НПУ, ВИП и КГРП приходится на различные периоды онтогенеза человека. Своего максимума ($14,8 \pm 1,16\%$, $p < 0,001$) иммунореактивность к НПУ достигает в тимусе новорожденных детей, а наибольшая экспрессия ВИП ($26,2 \pm 1,83\%$, $p < 0,001$) и КГРП ($16,4 \pm 1,16\%$, $p < 0,001$) отмечается в тимусе плодов человека 24–27-недельного возраста (рисунок 1).

Наши результаты свидетельствуют о том, что возрастная динамика экспрессии двух «сосудорасширяющих» нейропептидов – вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе человека хотя и носит сходный характер, однако участие этих двух регуляторных пептидов в морфофункциональных процессах, происходящих в тимусе человека, неравнозначно.

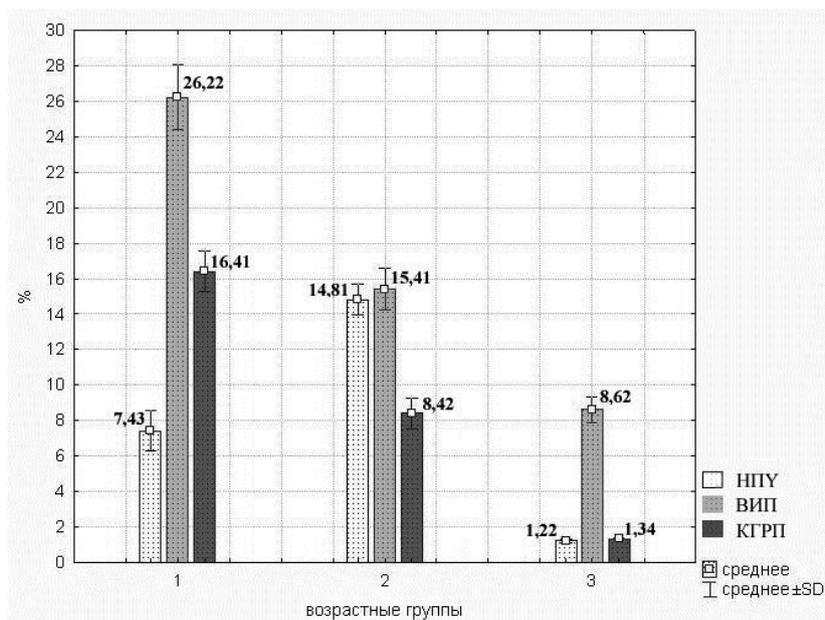


Рисунок 1 – Возрастные изменения показателя экспрессии НПУ, ВИП и КГРП в тимусе человека

Это заключение подтверждается статистически значимым ($p < 0,001$) увеличением показателя экспрессии ВИП ($26,2 \pm 1,83\%$) по сравнению с показателем экспрессии КГРП ($16,4 \pm 1,16\%$) в тимусе плодов человека 24–27 недельного возраста. Такие же различия в иммунореактивности к ВИП и КГРП сохранялись в тимусе новорожденных ($15,4 \pm 1,16\%$ и $8,4 \pm 0,86\%$, $p < 0,001$) и взрослых ($8,6 \pm 0,74\%$ и $1,34 \pm 0,06\%$, $p < 0,001$). Несмотря на то, что в тимусе взрослых показатель экспрессии КГРП был меньше ($p < 0,001$) по сравнению с показателем экспрессии ВИП, большая часть иммунореактивных к КГРП и ВИП структур была представлена тельцами Гассалья и нервными волокнами, что подтверждает сохранение эндокринных функций и пептидергической нервной регуляции тимуса взрослого человека.

Таким образом, достоверно большие ($p < 0,001$) значения показателей экспрессии НПУ, ВИП и КГРП в тимусе плодов и новорожденных по сравнению с показателями экспрессии нейропептидов в органе взрослых позволяет заключить, что экспрессия НПУ, ВИП и КГРП в клеточных популяциях является характерным признаком развивающегося тимуса в пренатальном и неонатальном периодах онтогенеза человека.

Между тем, в каждой возрастной группе в тимусе выявлены свои закономерности распределения иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП. В тимусе плодов среди иммунореактивных к нейропептидам структур большинство составляли ВИП-ИР ($26,2 \pm 1,83\%$) и КГРП-ИР ($16,4 \pm 1,16\%$) клетки. Экспрессия НПУ по сравнению с иммунореактивностью к ВИП и КГРП проявлялась в значительно меньшей степени ($7,4 \pm 0,86\%$). В тимусе

новорожденного показателя экспрессии НПУ и ВИП находились примерно на одном уровне ($14,8\pm 1,16\%$ и $15,41\pm 1$). Показатель экспрессии КГРП был почти в два раза меньше ($8,4\pm 0,86\%$, $p < 0,001$) по сравнению с иммунореактивностью к ВИП и НПУ. В тимусе взрослых, по сравнению с тимусом плодов и новорожденных, наблюдалось значительное снижение количества иммунореактивных к НПУ, ВИП и КГРП клеточных структур (рисунок 1). Показатель экспрессии ВИП составлял $8,6\pm 0,74\%$, что значительно больше по сравнению с показателями экспрессии НПУ ($1,2\pm 0,11\%$, $p < 0,001$) и КГРП ($1,34\pm 0,06\%$, $p < 0,001$).

Вариабельность показателей экспрессии НПУ, ВИП и КГРП в тимусе плодов, новорожденных детей и взрослых свидетельствуют о том, что несмотря на общность локализации в клетках и нервных волокнах тимуса, нейропептиды обладают различным спектром биологической активности в органе в определенный период онтогенеза человека. Установлено, что модулирующие функции НПУ, ВИП и КГРП в тимусе в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза человека могут изменяться. Результаты экспериментальных исследований *in vivo* и *in vitro*, проведенных на тимусе плодов, новорожденных и взрослых белых мышей, показали, что у новорожденных мышей нейропептид Y стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов; в тимусе плодов НПУ оказывает противоположный эффект, снижая количество тимоцитов, а у взрослых животных он не оказывает влияния на численность популяции Т-клеток [Medina S., 2000; Silva A., 2011]. КГРП может обладать ингибиторным эффектом, индуцируя спонтанный апоптоз в фетальной культуре тимоцитов и стимулировать пролиферацию культивированных тимусных эпителиальных клеток у взрослых животных [Bulloch K., 1994; Head G., 1998].

Неодинаковое участие НПУ, ВИП и КГРП в процессах созревания, пролиферации, дифференцировки, селекции и миграции Т-лимфоцитов в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза человека подтверждается не только вариабельностью их экспрессии в тимусе плодов, новорожденных и взрослых. В различные периоды онтогенеза человека в тимусе изменяется распределение иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП в субкапсулярной, внутренней кортикальной и медуллярной зонах органа. В тимусе плодов экспрессия ВИП и КГРП выявляется во всех зонах органа, иммунореактивность к НПУ ограничивается субкортикальной и медуллярной зонами тимуса. С рождением ребенка распределение иммунореактивности к нейропептидам в тимусе изменяется. У новорожденного НПУ-ИР клеточные структуры появлялись в субкапсулярной зоне органа, тогда как экспрессия ВИП и КГРП в ней не выявлялась. Иммунореактивность к КГРП, в отличие от

экспрессии НПУ и ВИП, не выявлялась во внутренней кортикальной зоне органа. У взрослого человека иммунореактивные к НПУ, ВИП и КГРП клеточные структуры прослеживались, как правило, в медуллярной зоне.

Отличия в распределении иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП в разных зонах тимуса плодов, новорожденных и взрослых могут быть связаны с различным участием НПУ, ВИП и КГРП в модуляции тимопоэза. Действительно, разные зоны тимуса ответственны за определенные стадии развития Т-лимфоцитов [Kendall M., 1991]. Выявленная нами вариабельность экспрессии НПУ, ВИП и КГРП в субкапсулярной, внутренней кортикальной и медуллярной зонах тимуса плодов, новорожденных детей и взрослого человека подтверждает их неодинаковую роль в процессах созревания, пролиферации, дифференцировки и селекции Т-клеток.

Возрастные изменения иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП в тельцах Гассалья и нервных волокнах тимуса человека также имеют свои закономерности.

В тимусе плодов отмечается незначительное количество иммунореактивных к НПУ ($0,33 \pm 0,19\%$), ВИП ($1,65 \pm 0,31\%$) и КГРП ($0,74 \pm 0,08\%$) тимических телец. При этом, количество телец Гассалья с экспрессией ВИП было больше, по сравнению с НПУ-ИР ($p < 0,05$) и КГРП-ИР ($p < 0,05$) тимическими тельцами (рисунок 2).

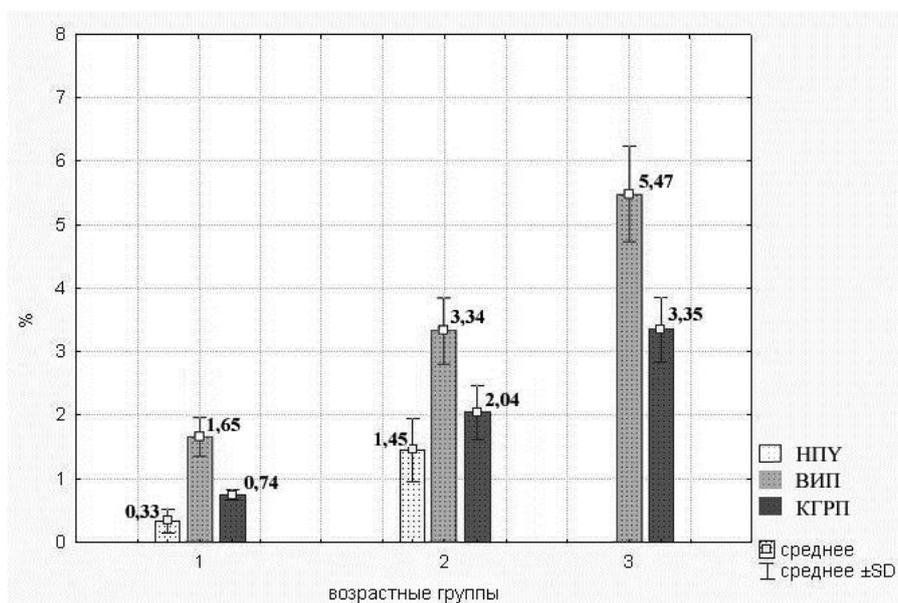


Рисунок 2 – Возрастные изменения иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП в тельцах Гассалья

К рождению ребенка повышалась иммунореактивность к НПУ ($p < 0,001$), ВИП ($p < 0,05$) и КГРП ($p < 0,001$) в тельцах Гассалья. Однако, среди синтезирующих нейропептиды телец, большинство по-прежнему

составляли ВИП-ИР структуры. Количество иммунореактивных к ВИП телец Гассалья в тимусе новорожденных составляло $3,34 \pm 0,53\%$, что достоверно больше по сравнению с синтезирующими НПУ ($1,45 \pm 0,50\%$, $p < 0,05$) и КГРП ($2,04 \pm 0,43\%$ $p < 0,05$) тельцами. Вместе с тем, в тимусе взрослых экспрессия НПУ в тимических тельцах не выявлялась, однако, в них значительно повышалась иммунореактивность к ВИП ($5,47 \pm 0,75\%$, $p < 0,001$) и, в меньшей степени, к КГРП ($3,35 \pm 0,51\%$, $p < 0,05$). Таким образом, несмотря на значительное снижение в тимусе взрослого человека показателей экспрессии ВИП и КГРП по сравнению с аналогичными показателями в тимусе плодов и новорожденных, иммунореактивность к ВИП и КГРП в тельцах Гассалья повышается (рисунки 1, 2). Принимая во внимание гормон-продуцирующую способность тимических телец и модулирующие функции ВИП и КГРП в регуляции иммунных функций [Delgado M., 2004; Watanabe N., 2005], можно предположить, что усиление экспрессии ВИП и КГРП в тельцах Гассалья является компенсаторным ответом иммунной системы человека на уменьшение функционально активной паренхимы тимуса вследствие возрастной инволюции.

В нервных волокнах тимуса человека выявлены возрастные особенности изменений иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП. У плодов человека в тимусе отмечают иммунореактивные к НПУ ($1,05 \pm 0,47\%$ на мм^2), ВИП ($1,22 \pm 0,27\%$ на мм^2) и КГРП ($2,47 \pm 0,58\%$ на мм^2) нервные волокна. При этом, количество КГРП-ИР нервных волокон было большим по сравнению с НПУ-ИР ($p < 0,05$) и ВИП-ИР ($p < 0,05$) нервными волокнами. В тимусе новорожденного ребенка отмечается достоверное ($p < 0,001$), по сравнению с ВИП и КГРП, повышение экспрессии НПУ в нервных волокнах – их количество составляло $3,59 \pm 0,69\%$ на мм^2 . Между тем, статистически значимых различий в экспрессии ВИП ($2,15 \pm 0,53\%$ на мм^2) и КГРП ($1,48 \pm 0,45\%$ на мм^2) в нервных волокнах тимуса новорожденного ребенка не выявлено (рисунок 3).

В тимусе взрослых экспрессия НПУ в нервных волокнах ($3,31 \pm 0,63\%$ на мм^2) сохранялась на таком же, как и у новорожденных, уровне. Между тем, по сравнению с новорожденными в тимусе взрослых уменьшалось число ВИП-ИР ($p < 0,05$) и КГРП-ИР ($p < 0,05$) нервных волокон. Количество иммунореактивных к ВИП нервных волокон составляло $1,03 \pm 0,41\%$ на мм^2 , а КГРП-ИР – $0,29 \pm 0,11\%$ на мм^2 (рисунок 3).

Выявление НПУ-ИР, ВИП-ИР и КГРП-ИР нервных волокон в периваскулярных пространствах тимуса человека объясняется влиянием нейропептидов на проницаемость сосудистой стенки и величину просвета кровеносных сосудов.

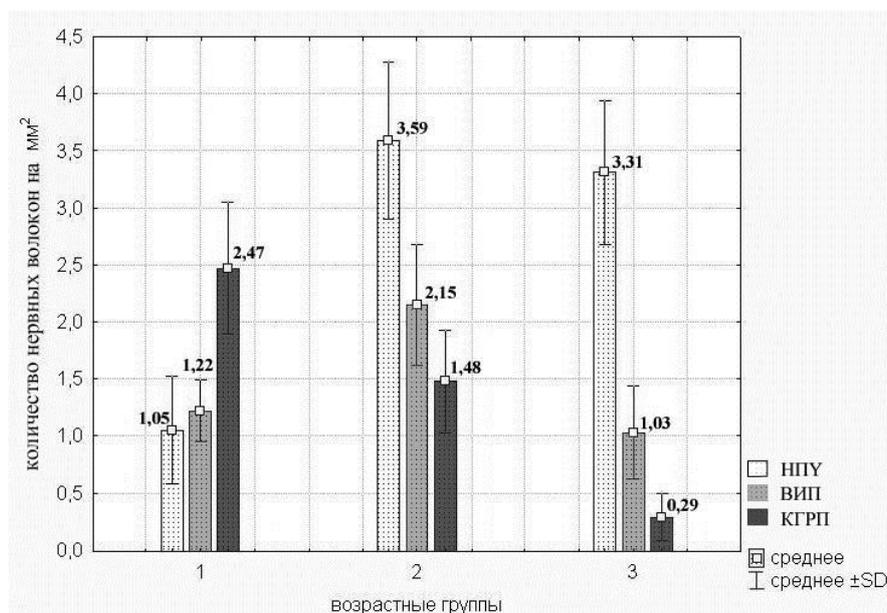


Рисунок 3 – Возрастные изменения иммунореактивности НPY, VIP и KGRP в нервных волокнах

Действуя как вазоконстрикторы (НPY) или вазодилататоры (VIP и KGRP), нейропептиды способны регулировать поступление в тимус предшественников тимоцитов – стволовых клеток из красного костного мозга, а также влиять на транспорт Т-клеток из тимуса во вторичные лимфоидные органы [Serizawa H., 1996; Miura S., 1997]. Более того, выделяясь из нервных окончаний в межклеточное пространство, НPY, VIP и KGRP могут оказывать паракринное модулирующее влияние на интратимические этапы Т-клеточной пролиферации и дифференцировки [Bedoui S., 2003; Smalley S., 2009].

Характеризуя многовекторный характер биологического действия нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в иммунной системе, необходимо остановиться на их роли в развитии патологических процессов.

Угнетая синтез оксида азота, вазоактивный интестинальный полипептид может выполнять протекторную функцию, ингибируя программированную гибель клеток [Xin Z., 1998; Delgado M., 1999]. Однако это важное протекторное свойство VIP может иметь и негативные для организма человека последствия – подавляя гибель аутореактивных клеток в тимусе, вазоактивный интестинальный полипептид способен инициировать развитие аутоиммунных заболеваний, таких как аутоиммунный тиреоидит, миастения, сахарный диабет 1-го типа и других [Руденок В.В., 2002; Hsu H., 2003]. При иммуногистохимическом исследовании тимомы, возникающей при миастении, показано повышение экспрессии вазоактивного интестинального полипептида в

клеточных популяциях кортикальной и медуллярной зон тимуса на фоне снижения количества ВИП-ИР и НПУ-ИР нервных волокон вокруг сосудов. Нарушение сбалансированного соотношения нейропептидов в клеточных популяциях и нервных волокнах тимуса может являться одной из основных причин развития этого аутоиммунного заболевания. Избыточная продукция ВИП в клетках тимуса приводит к подавлению апоптоза и накоплению аутореактивных Т-клеток, а редукция количества ВИП-ИР и НПУ-ИР нервных волокон в периваскулярных пространствах тимуса – к нарушению миграции Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы, что приводит к прогрессивному росту тимомы [Mignini F., 2011]. Не исключено, что одной из причин возникновения врожденных и приобретенных иммунодефицитных состояний у человека может быть дисбаланс синтеза нейропептидов в тимусе.

Таким образом, полученные результаты характеризуют нейропептидную гетерогенность тимуса человека. При этом иммунореактивность к нейропептиду Y, вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе изменяется в различные периоды онтогенеза человека, что является проявлением свойства пластичности экспрессии нейропептидов и их модулирующих функций в иммунной системе человека. Перспективным направлением исследований может стать дальнейшее изучение биологических свойств НПУ, ВИП и КГРП в органах иммунной системы человека, в том числе и роли возрастных конформационных перестроек нейропептидов в регуляции иммунных функций в норме и при патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Гетерогенность экспрессии нейротрансмиттеров пептидной природы в тимусе закономерно проявляется в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза человека. В клеточных популяциях, тельцах Гассалья и нервных волокнах тимуса плодов, новорожденных детей и взрослых выявляется различной выраженности иммунореактивность к нейропептиду Y, вазоактивному интестинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду. Экспрессия НПУ, ВИП и КГРП в тимусе человека может свидетельствовать об участии нейропептидов в модуляции процессов тимопоэза, а также нервной и эндокринной регуляции иммунных функций [1, 3–7, 9, 17].

2. В тимусе плодов, новорожденных детей и взрослого человека выявляются различия между уровнями иммунореактивности нейропептида

Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида. В тимусе плодов наибольшая иммунореактивность к ВИП проявляется в клеточных популяциях ($26,2 \pm 1,83\%$) и тельцах Гассалья ($1,65 \pm 0,31\%$), максимальная экспрессия КГРП отмечается в нервных волокнах ($2,47 \pm 0,58\%$ на мм^2). У новорожденных большинство иммунореактивных к нейропептидам структур составляют НПУ-ИР ($14,8 \pm 1,16\%$) и ВИП-ИР клетки ($15,4 \pm 1,16\%$), ВИП-ИР тельца Гассалья ($3,34 \pm 0,53\%$) и НПУ-ИР нервные волокна ($3,59 \pm 0,69\%$ на мм^2). В тимусе взрослых преобладают ВИП-ИР клеточные структуры ($8,6 \pm 0,74\%$), ВИП-ИР тельца Гассалья ($5,47 \pm 0,75\%$) и НПУ-ИР нервные волокна ($3,31 \pm 0,63\%$ на мм^2). Отличия уровней иммунореактивности к НПУ, ВИП и КГРП в клетках паренхимы, тельцах Гассалья и нервных волокнах тимуса плодов, новорожденных детей и взрослого человека могут быть связаны как с неодинаковым участием нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в процессах роста, дифференцировки, селекции и миграции Т-лимфоцитов, так и в обеспечении нервных и гуморальных механизмов регуляции функций органа в пренатальном и постнатальном периодах развития человека [3–7, 10, 13, 15].

3. В онтогенезе человека экспрессия нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе подвержена возрастным изменениям. Иммунореактивность к нейропептиду Y в тимусе плодов составляет $7,4 \pm 0,86\%$ и достигает своего максимума ($14,8 \pm 1,16\%$) у новорожденных детей. Возрастная динамика экспрессии вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида носит сходный характер и отличается от нейропептида Y. Наибольшая иммунореактивность к ВИП и КГРП выявляется в клетках тимуса плодов ($26,2 \pm 1,83\%$ и $16,4 \pm 1,16\%$ соответственно), снижаясь к периоду новорожденности до $15,4 \pm 1,16\%$ и $8,4 \pm 0,86\%$ соответственно. Минимальная экспрессия нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида отмечается в клеточных популяциях тимуса взрослого человека. Вариабельность экспрессии нейропептидов свидетельствует о неодинаковой роли нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в морфофункциональных процессах, происходящих в тимусе человека на разных этапах онтогенеза [2–7, 8, 12, 14, 16].

4. Возрастные изменения экспрессии нейропептидов в тимусе человека отражают уровень цитохимической зрелости и/или функциональной активности органа в определенный период онтогенеза.

Значительная экспрессия нейропептида Y в клеточных популяциях тимуса новорожденных ($14,8 \pm 1,16\%$), вазоактивного интестинального полипептида ($26,2 \pm 1,83\%$) и кальцитонин ген-родственного пептида ($16,4 \pm 1,16\%$) в тимусе плодов характеризует высокую интенсивность морфогенетических процессов тимуса человека в плодном и неонатальном периодах онтогенеза. В тимусе взрослого человека выявление экспрессии НПУ, ВИП и КГРП ($3,31 \pm 0,63\%$, $1,03 \pm 0,41\%$, $0,29 \pm 0,11\%$ на мм^2 соответственно) в нервных волокнах и достоверное повышение иммунореактивности к ВИП и КГРП ($5,47 \pm 0,75\%$ и $3,35 \pm 0,51\%$ соответственно) в тельцах Гассала по сравнению с тимусом плодов и новорожденных детей может свидетельствовать о сохранении нервной регуляции, а также иммунной и эндокринной функций тимуса на фоне уменьшения его паренхимы вследствие возрастной инволюции [3–8, 11].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Согласно разработанной и утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению «Способ выявления регуляторных пептидов в биопсийном и аутопсийном материале с использованием иммунопероксидазного метода» (регистрационный № 110-0812) [18], данные об экспрессии нейропептида Y, вазоактивного интестинального полипептида и кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе плодов, новорожденных и взрослых могут использоваться в патоморфологической диагностике иммунодефицитных состояний, аутоиммунной, инфекционной и онкологической патологии. Инструкция по применению внедрена в практическую деятельность УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» г. Минска (акт о внедрении от 17.12.2012 г.).

2. Результаты исследования могут быть использованы как нормативные для определения цитохимических критериев зрелости и функциональной активности тимуса в различные периоды онтогенеза человека, а также могут найти применение при разработке новых лекарственных препаратов, оказывающих влияние на цитохимические и модулирующие свойства нейропептидов в иммунной системе у больных различных возрастных групп.

3. Материалы исследования рекомендуется использовать в учебном процессе для студентов медицинских вузов и слушателей факультетов последиplomного образования при изучении органов иммунной системы и иммунопатологии на кафедрах медико-биологического и клинического профилей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Публикации в рецензируемых журналах

1. Sokal, A. Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in human thymus / A. Sokal, V. Roudenok, W. Kühnel // *Eesti Arst.* – 2005. – № 6. – P. 115–116.

2. Сокол, А.В. Экспрессия вазоактивного интестинального полипептида в тимусе человека / А.В. Сокол // *Аллергология и иммунология.* – 2007. – Т. 89, № 1. – С. 83–84.

3. Сокол, А.В. Возрастная динамика экспрессии нейропептида Y в тимусе человека / А.В. Сокол, В.В. Руденок // *Мед. журн.* – 2012. – № 1. – С. 81–84.

4. Сокол, А.В. Распределение иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе плодов и новорожденных человека / А.В. Сокол, В.В. Руденок // *Мед. журн.* – 2012. – № 1. – С. 84–86.

5. Сокол, А.В. Динамика экспрессии вазоактивного интестинального полипептида в тимусе человека / А.В. Сокол, В.В. Руденок // *Военная медицина.* – 2012. – № 2. – С. 110–112.

6. Сокол, А.В. Исследование иммунореактивности к кальцитонин-ген родственному пептиду в тимусе человека / А.В. Сокол // *Военная медицина.* – 2012. – № 3. – С. 117–120.

7. Сокол, А.В. Динамика экспрессии вазоактивного интестинального полипептида в тимусе плодов и новорожденных человека / А.В. Сокол, В.В. Руденок // *Имунопатология. Аллергология. Инфектология.* – 2012. – № 3. – С. 81–86.

Материалы научных конференций

8. Руденок, В.В. Распределение вазоактивного интестинального полипептида в тимусе человека / В.В. Руденок, В. Кюнель, А.В. Сокол, В.Г. Богдан, О.В. Новиков // *Фундаментальные проблемы морфологии: материалы междунар. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения акад. П.Я. Герке / под ред. С.Д. Денисова, Б.А. Слуки.* – Минск, 2004. – С. 95–96.

9. Сокол, А.В. Экспрессия вазоактивного интестинального полипептида в тимусе человека / А.В. Сокол // *Актуальные проблемы современной медицины 2005 : материалы междунар. науч. конф. студентов и молодых учёных / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. С.Л. Кабака, А.С. Леонтьюка.* – Минск, 2005. – С. 290–293.

10. Руденок, В.В. Экспрессия вазоактивного интестинального полипептида в тимусе человека / В.В. Руденок, А.В. Сокол, С.А. Игумнов // *Актуальные проблемы морфологии: сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию Белорус. гос. мед. ун-та / под ред. П.Г. Пивченко.* – Минск, 2006. – С. 134–135.

11. Сокол, А.В. Иммунореактивность к вазоактивному кишечинальному полипептиду в тимусе человека при хроническом тиреоидите / А.В. Сокол, В.В. Руденок // Актуальные вопросы морфологии: сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию каф. анатомии человека ГрГМУ, Гродно, 26–27 июня 2008 г. / под ред. Е.С. Околокулака. – Гродно, 2008. – С. 107–108.

12. Сокол, А.В. Иммунореактивность к вазоактивному кишечинальному полипептиду в тимусе / А.В. Сокол, В.В. Руденок, В. Кюннель // Морфология : сб. тр. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения Д.А. Жданова. – 2008. – Т. 133, № 4 – С. 93.

13. Сокол, А.В. Распределение иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе человека / А.В. Сокол, А.В. Никитский, О.С. Саёт, В.В. Руденок // Современные аспекты фундаментальной и прикладной морфологии: сб. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 110-летию со дня рождения акад. НАН Беларуси Д.М. Голуба / под ред. П.И. Лобко, П.Г. Пивченко – Минск, 2011. – С. 243–246.

14. Сокол, А.В. Распределение иммунореактивности к нейропептиду Y в тимусе человека / А.В. Сокол // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. : в 2 т. – Минск, 2011. – Т. 1. – С. 88.

Тезисы докладов

15. Roudenok, V. Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in human thymus after chronic thyroiditis / V. Roudenok, A. Hancharov, V. Bogdanovich, A. Sokal, W. Kühnel // Ann Anat. – 2005. – Vol. 187. – P. 60.

16. Sokal, A. The distribution of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in human thymus / A. Sokal, V. Roudenok, W. Kühnel, A. Hancharov, V. Bogdan // Ann Anat. – 2005. – Vol. 187. – P. 297.

17. Roudenok, V.V. Alteration of vasoactive intestinal polypeptide, substance P and neuropeptide Y expression in the human thymus after chronic thyroiditis / V. Roudenok, A. Nikitski, A. Sokol // Global strategic Center for Radiation Health Risk Control : abstr. 6th Intern. Symp. of Nagasaki University Global COE. – 2011. – P. 103–104.

Инструкции по применению, утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь

18. Способ выявления регуляторных пептидов в биопсийном и аутопсийном материале с использованием иммунопероксидазного метода : инструкция по применению № 110-0812 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 09.08.2012 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь; сост. В.В. Руденок, О.С. Саёт, А.В. Сокол, А.В. Никитский, Н.А. Трушель. – Минск, 2012. – 6 с.

РЭЗЮМЭ

Сокал Андрэй Валянцінавіч

Узроставаы дынаміка экспрэсіі нейрапептыдаў у тымусе чалавека

Ключавыя словы: тымус чалавека, нейрапептыды, рэгуляцыя імунітэта, экспрэсія, антагенез.

Аб'ект даследавання: аўтапсійны матэрыял тымуса пладоў, нованароджаных дзяцей і дарослага чалавека.

Мэта работы: выявіць змены экспрэсіі нейрапептыду Y (НПУ), вазаактыўнага інтэстынальнага поліпептыду (VIP) і кальцытанін ген-роднаснага пептыду (КГРП) у тымусе чалавека ў антагенезе.

Метады даследавання: непрамы імуннагістахімічны, гісталагічны, морфаметрычны, статыстычны.

Выкарыстаная апаратура: універсальны фотамікраскоп «Ахіорфот» (Zeiss), светлавы мікраскоп «Olympus», сістэма аўтаматычнага аналізу адлюстраванняў і камп'ютарнай апрацоўкі даных, замарожваючы аўтаматычны мікратом «Jung» (Leika).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: упершыню праведзена даследаванне экспрэсіі нейрапептыдаў у тымусе чалавека ў антагенезе. Устаноўлена, што імунарэактыўнасць да НПУ, VIP і КГРП у структурах тымуса схільная да ўзроставых змен. Максимальнага значэння паказчык экспрэсіі НПУ дасягае ў клетках тымуса нованароджаных, VIP і КГРП – у тымусе пладоў. Устаноўлена нейрапептыдная гетэрагеннасць тымуса, якая выяўляецца ў экспрэсіі НПУ, VIP і КГРП клеткамі, тымічнымі цельцамі і нервовымі валокнамі. Выяўлены адрозненні ў экспрэсіі нейрапептыдаў у розных зонах тымуса. Узроставаы змены экспрэсіі нейрапептыдаў у тымусе чалавека адлюстроўваюць узровень цытахімічнай сталасці і/або функцыянальнай актыўнасці органа ў пэўны перыяд антагенезу.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя новыя даныя могуць выкарыстоўвацца як нарматыўныя для вызначэння цытахімічных крытэрыяў сталасці і функцыянальнай актыўнасці тымуса; у патамарфалагічнай дыягностыцы імунадэфіцытных станаў, аўтаімуннай, інфекцыйнай і анкалагічнай паталогіі; пры карэкцыі імуналагічных парушэнняў плода і выходжванні неданошаных нованароджаных; у навучальным працэсе.

Вобласць прымянення: гісталагія, цыталогія і эмбрыялогія, нармальнаы і паталагічная анатомія, імуналогія і імунпаталогія, фармакалогія, судовая медыцына, акушэрства, педыятрыя, унутраныя і інфекцыйныя хваробы, анкалогія.

РЕЗЮМЕ

Сокол Андрей Валентинович

Возрастная динамика экспрессии нейропептидов в тимусе человека

Ключевые слова: тимус человека, нейропептиды, регуляция иммунитета, экспрессия, онтогенез.

Объект исследования: аутопсийный материал тимуса плодов, новорожденных детей и взрослого человека.

Цель работы: выявить изменения экспрессии нейропептида Y (НПУ), вазоактивного интестинального полипептида (ВИП) и кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) в тимусе человека в онтогенезе.

Методы исследования: непрямой иммуногистохимический, гистологический, морфометрический, статистический.

Использованная аппаратура: универсальный фотомикроскоп «Ахиорфот» (Zeiss), световой микроскоп «Olympus», система автоматического анализа изображений и компьютерной обработки данных, замораживающий автоматический микротом «Jung» (Leika).

Полученные результаты и их новизна: впервые проведено исследование экспрессии нейропептидов в тимусе человека в онтогенезе. Установлено, что иммунореактивность к НПУ, ВИП и КГРП в структурах тимуса подвержена возрастным изменениям. Максимального значения показатель экспрессии НПУ достигает в клетках тимуса новорожденных, ВИП и КГРП – в тимусе плодов. Установлена нейропептидная гетерогенность тимуса, выражающаяся в экспрессии НПУ, ВИП и КГРП клетками, тимическими тельцами и нервными волокнами. Выявлены отличия в экспрессии нейропептидов в разных зонах тимуса. Возрастные изменения экспрессии нейропептидов в тимусе человека отражают уровень цитохимической зрелости и/или функциональной активности органа в определенный период онтогенеза.

Рекомендации по использованию: полученные новые данные могут использоваться как нормативные для определения цитохимических критериев зрелости и функциональной активности тимуса; в патоморфологической диагностике иммунодефицитных состояний, аутоиммунной, инфекционной и онкологической патологии; при коррекции иммунологических нарушений плода и выхаживании недоношенных новорожденных; в учебном процессе.

Область применения: гистология, цитология и эмбриология, нормальная и патологическая анатомия, иммунология и иммунопатология, фармакология судебная медицина, акушерство, педиатрия, внутренние и инфекционные болезни, онкология.

SUMMARY

Sokal Andrei Valentinovich

Age-dependent change of neuropeptides expression in the human thymus

Key words: human thymus, neuropeptides, regulation of immunity, expression, ontogeny.

Object of research: autopsy material of thymus of fetuses, infants and adults.

Purpose of research: to identify changes in the expression of neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the human thymus during ontogeny.

Methods of research: histological, indirect immunohistochemical, morphometrical, statistical.

Equipment used: Universal photomicroscope “Axiophot” (Zeiss), light microscope “Olympus”, automatic images system and computer processing data, automatic cryostat microtome “Jung” (Leika).

The results and their novelty: for the first time immunohistochemical study of age dynamics of neuropeptide expression in the human thymus during ontogeny was conducted. It has been established that immunoreactivity to NPY, VIP and CGRP in the thymus structures undergoes age-related changes. Maximum NPY expression was determined in the thymus of newborns, VIP and CGRP expression – in the thymus of fetuses. Neuropeptide heterogeneity of thymus is manifested by the expression of regulatory peptides: neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin gene-related peptides in cells, thymic corpuscles and nerve fibers. Differences in the distribution of neuropeptides depending on the thymus area were revealed. Age-related changes in the expression of neuropeptides in the human thymus reflect the level of cytochemical maturity and/or functional activity of the organ in different periods of ontogeny.

Recommendations for application: the new data obtained on the age-dependent dynamics of neuropeptide expression in the human thymus can be used for developing neurochemical criteria of maturity and functional activity of the thymus in fetuses, newborns and adults; in the diagnosis of immunodeficiency, autoimmune, infectious and oncologic pathology in patients of different age groups; in the development of new drugs affecting the functions of the immune system; in correcting immunologic fetal defects and nursing premature infants; in undergraduate and postgraduate medical education.

The area of application: histology, cytology and embryology, anatomy, pathology, immunology and immunopathology, pharmacology, forensic medicine, obstetrics and gynecology, pediatrics, internal diseases, infectious diseases, oncology.

Подписано в печать 03.05.13. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».

Ризография. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 1,28. Тираж 60 экз. Заказ 278.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.