

*Боровая Т. Г., Диденко Л. В., Наровлянский А. Н.,
Иванова А. М., Шевлягина Н. В., Санин А. В., Пронин А. В.*

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
АЛЬФА-РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРАДИОЛА В КОРТИКОСТЕРОЦИТАХ
И ХРОМАФФИНОЦИТАХ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ОСТРОЙ
ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТОМ «ФОРТЕПРЕН»**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва*

О присутствии альфа-рецепторов эстрадиола (α РЭ) в клетках надпочечников говорят результаты экспериментальных исследований, выполненных на различных видах животных в разные периоды онтогенеза [6, 7]. Данный подтип рецепторов зарегистрирован и в клетках надпочечников человека [5]. Поскольку в эволюции эстрогены возникли значительно раньше других стероидных гормонов и основой их биологических эффектов является действие на процесс транскрипции клеток-мишеней [2, 3, 4], можно полагать, что роль этих гормонов в развитии и физиологии надпочечников не менее значима, чем влияние известных нейроэндокринных факторов. Эстрадиол связывается со специфическими рецепторами, локализованными в ядре клетки, и влияет на процессы транскрипции и РНК, участвуя, таким образом, в регуляции синтеза эффекторных белков, процессов пролиферации, дифференцировки и функциональной деятельности клеток.

При герпес-вирусных инфекциях вирус встраивается в ДНК клетки-хозяина, затем клеточные транскриптазы обеспечивают транскрипцию вирусной ДНК, а вирусоспецифическая ДНК-полимераза осуществляет репликацию вирусной ДНК. Таким образом, очевидно, что при герпес-вирусной инфекции неизбежно влияние вируса на физиологические процессы в ядре клетки, в том числе – и на процессы, связанные с работой эстрадиол-рецепторного комплекса. В связи с этим представляется теоретически обоснованным и практически значимым исследование влияния ДНК-содержащих вирусов (в частности герпес-вирусов) на альфа-рецепторы эстрадиола в надпочечнике, поскольку этот орган относится к жизненно важным регуляторам всех метаболических процессов организма. Другой не менее актуальной задачей является поиск медикаментозных препаратов, нейтрализующих отрицательное влияние вируса на клетки-мишени в условиях инфекционного процесса.

Материал и методы исследования. Объектами исследования служили правый и левый надпочечники половозрелых самок морских свинок, находившихся в стадии диэструс полового цикла. Животные были распределены на три группы: 1 группа – морские свинки в стадии диэструс (контроль, $n = 2$); 2 группа – животные, зараженные вирусом простого герпеса 2 типа (ВПГ-2), не получавшие фортепрен ($n = 2$); 3 группа – животные, инфицированные ВПГ-2 ($n = 2$), которым

через двое суток после появления первых признаков заболевания был внутримышечно введен фортепрен (фоспренил) 0,4 % (производитель ЗАО «Микро-Плюс», серия N 10120) из расчета 4 мг/кг (в объеме 450 мкл). Заражение производили вирусом простого герпеса 2-го типа (штамм «ВН», ФГУ «НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского» МЗ РФ) путем внутривагинального введения 100 мкл вирус-содержащего материала. Вирус предварительно был размножен на перевиваемой культуре клеток Vero, и его титр соответствовал 105 ТЦД₅₀ (5,0 lg ТЦД₅₀/мл). Животные выводились из эксперимента парами хлороформа. Забор надпочечников производили на 10-е сутки после инфицирования. Надпочечники фиксировали 10 % нейтральным формалином, заключали в парафиновые блоки по общепринятой методике. Серийные срезы толщиной 7 мкм на стеклах с полилизинным покрытием депарафинировали и проводили непрямую реакцию иммуномечения с использованием моноклональных мышинных антител к альфа-рецепторам эстрадиола, клон С-542 (фирмы Abcam, США) в разведении 1:100, HPR-конъюгата (фирмы DAKO) и DAB-системы визуализации. Контроль на неспецифичность связывания антител проводили по тому же протоколу, но без инкубации с первыми (специфическими к рецепторам эстрадиола) антителами. Препараты анализировали в световом микроскопе Axiostar plus (Zeiss, Germany). Ввиду варьирования степени иммуногистохимического окрашивания ядер (от ярко выраженной до слабой) докрашивание ядер гематоксилином не производили во избежание «маскировки реакции». Учитывая отсутствие литературных аналогов по изучению альфа-рецепторного аппарата клеток надпочечников в условиях герпес-вирусной инфекции, на данном этапе эксперимента был выполнен лишь качественный (без количественной обработки препаратов) уровень анализа иммуногистохимических срезов, полученных от животных всех трех указанных выше групп. Анализ был предпринят для выяснения топографических различий в локализации метки как в пределах разных зон надпочечников, так и в составе клеточных компартментов кортикостероцитов и хромаффиноцитов. Исследование образцов проводили в 100 полях зрения в каждой группе при общем увеличении микроскопа, равном 400, с акцентом на визуальное снижение/увеличение численности меченых ядер в выбранном поле зрения и регистрации присутствия/отсутствия метки в цитоплазме клеток.

Результаты исследования. Субкортикальная область (СкО) и клубочковая зона (КЗ) коркового вещества надпочечника.

В препаратах 1 группы в СкО коры надпочечников иммунная метка к альфа-рецепторам эстрадиола (α РЭ) не выявлялась ни в ядрах, ни в цитоплазме клеток. В кортикостероцитах (КсЦ) КЗ метка на α РЭ присутствовала практически только в ядрах и была хорошо выражена (рис. 1а). В образцах 2 группы метка зарегистрирована в ядрах клеток СкО, ядрах отдельных кортикостероцитов КЗ, в цитоплазме большинства кортикостероцитов КЗ в виде мелкой зернистости (рис. 1б). Ядра клеток, мигрирующих из субкортикальной области в пучковую зону, также позитивно метились антителами к эстрадиолу. В предыдущем исследовании эти клетки расценивались нами как камбиальные, возникающие при острой герпес-вирусной инфекции из клеточного резерва ростковой СкО [1]. В срезах надпочечников животных 3 группы метка присутствовала только в ядрах отдельных клеток СкО,

отчетливо выявлялась в ядрах КсЦ КЗ (рис. 1в) и в виде мелких зерен была представлена в цитоплазме КсЦ.

Пучковая зона. В препаратах 1 группы КсЦ с позитивно окрашенными ядрами были единичными в поле зрения микроскопа; при этом интенсивность окраски ядер варьировала от слабой до хорошо выраженной. В препаратах 2 группы в этой зоне визуально отмечалось увеличение численности окрашенных ядер в поле зрения микроскопа по сравнению с препаратами 1 группы; причем в значительной части КсЦ метились и ядра, и цитоплазма (последняя в виде «мелкой зернистости»). В ПЗ надпочечников 3 группы позитивно окрашивались ядра, хотя метка выявлялась и в цитоплазме КсЦ, но в отличие от препаратов 2 группы «зерна метки» были единичными.

Сетчатая зона. В препаратах 1 группы отмечалось интенсивное иммуномечение ядер большинства КсЦ. Во 2 группе количество КсЦ с окрашенными ядрами в поле зрения микроскопа было меньшим по сравнению с 1 группой; в отдельных КсЦ метка присутствовала и в цитоплазме. В препаратах надпочечников 3 группы были окрашены ядра КсЦ, но в каждом из исследованных полей зрения их было значительно меньше, чем в 1 группе. В цитоплазме КсЦ метка отсутствовала.

Мозговое вещество. В образцах 1 группы метка регистрировалась в ядрах большинства хромафиноцитов (ХафЦ) и не выявлялась в цитоплазме. В препаратах 2 группы картина выглядела прямо противоположной: окрашивались ядра единичных ХафЦ при интенсивном (сплошном) окрашивании цитоплазмы большинства ХафЦ. В образцах 3 группы метка в цитоплазме ХафЦ (как и в препаратах 1 группы) отсутствовала, окрашенными были только ядра ХафЦ, количество которых в поле зрения микроскопа визуально было снижено по сравнению с образцами 1 группы.

Обсуждение. В последние годы существенно расширились представления о механизме действия эстрадиола на клетки-мишени и структурно-функциональную организацию клеточных рецепторов эстрадиола. Ранее было принято считать, что цитозольные и ядерные рецепторы эстрадиола имеют разное строение. Исследования последних лет показали, что и ядерные, и цитозольные рецепторы эстрадиола по своим характеристикам аналогичны, а различия состоят в том, что первые представляют собой свободные (без лиганда) рецепторы, находящиеся в растворимой фракции клетки, или цитозоле, а вторые связаны с лигандом и ассоциированы с хроматином [2, 3, 4]. Кроме этого, было доказано наличие рецепторов эстрадиола в мембранах клеточных органелл. Свойства мембранных стероидных рецепторов и их роль в физиологии и патологии клеток-мишеней являлись объектом многолетних фундаментальных исследований отечественных ученых [2, 3, 4]. Результаты привели к заключению, что мембранные рецепторы обеспечивают быстрые эффекты эстрадиола, а именно: изменение ионной проницаемости клеточных мембран вследствие фосфорилирования молекул рецепторов. Ядерные рецепторы осуществляют медленные эффекты, связанные с транскрипцией и последующим синтезом широкого спектра белков-эффекторов. На основании данных, полученных в проведенном исследовании, можно заключить, что в системе взаимодействия эстрадиола с рецепторным аппаратом клеток-мишеней надпочечника физиологической является реализация медленных эффектов эстрадиола. Значительно

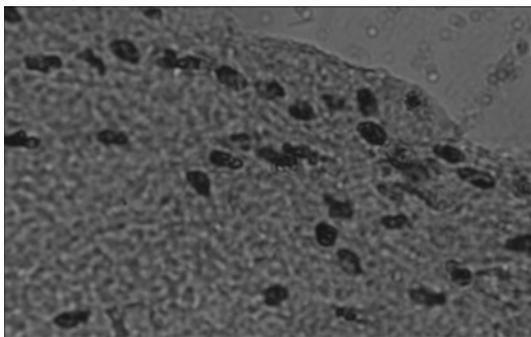


Рис. 1а. Клубочковая зона коры надпочечников морских свинок (контроль). Иммуногистохимическое окрашивание ядер кортикостероцитов на альфа-рецепторы эстрадиола. Ув. 400×

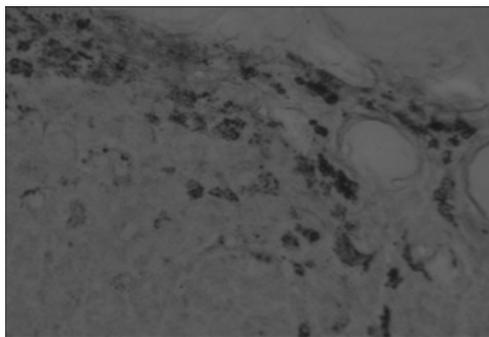


Рис. 1б. Клубочковая зона коры надпочечников инфицированных морских свинок, не получавших фортепреп. Иммуногистохимическое окрашивание цитоплазмы кортикостероцитов. Ув. 400×

большая интенсивность иммуномечения к альфа-рецепторам эстрадиола ядер клеток корковой и сетчатой зон надпочечников может указывать на большую функциональную зависимость клеток этих зон от регуляторных эффектов эстрадиола. Поскольку при герпес-вирусной инфекции позитивное иммуномечение на альфа-рецепторы эстрадиола регистрировалось в цитоплазме КсЦ всех зон коры и ХаФЦ мозгового вещества надпочечников, можно говорить о влиянии вируса генитального герпеса на эстрадиол-рецепторные отношения в исследованных клетках. При введении препарата «Фортепреп» характер распределения иммунной метки к альфа-рецепторам эстрадиола в клетках различных зон надпочечника был достаточно близок к таковому в препаратах контрольной группы и отличался от распределения метки в препаратах 2 группы. На основании этого можно предполагать протективное влияние «Фортепрепа» на эстрадиол-рецепторные отношения в исследованных клетках надпочечников.

Выводы.

1. В надпочечниках интактных морских свинок альфа-рецепторы эстрадиола выявляются в ядрах кортикостероцитов всех зон коры и хромаффиноцитов мозгового вещества надпочечников, что указывает на участие эстрадиола в регуляции физиологических функций этих клеток.

2. При острой герпес-вирусной инфекции происходит изменение цитотопографии альфа-рецепторов эстрадиола в кортикостероцитах и хромаффиноцитах

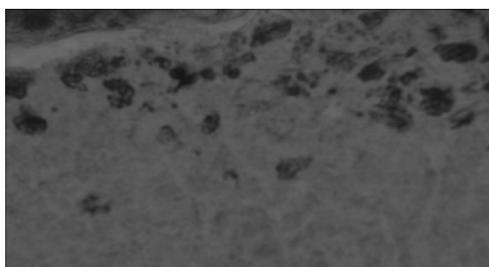


Рис. 1в. Клубочковая зона коры надпочечников инфицированных морских свинок, получавших фортепреп. Иммуногистохимическое окрашивание ядер и цитоплазмы кортикостероцитов. Ув. 400×

надпочечников — метка на альфа-рецепторы эстрадиола выявляется (помимо ядер) в цитоплазме клеток, что предполагает смещение активности эстрадиол-рецепторного влияния в сторону так называемого быстрого регуляторного эффекта.

3. При раннем введении животным с герпес-вирусной инфекцией препарата «Фортепрен» распределение и интенсивность метки на альфа-рецепторы эстрадиола в кортикостероцитах и хромаффиноцитах надпочечника меняются в сторону, близкую к физиологическим характеристикам, и свидетельствуют, вероятно, о протективных свойствах препарата по отношению к исследованным клеткам надпочечников.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Боровая Т. Г., Шевлягина Н. В., Иванова А. М., Наровлянский А. Н., Диденко Л. В.* Морфологические особенности надпочечников при острой генитальной герпесвирусной инфекции // *Морфология*. 2012. Т. 141(3). С. 27–32.
2. *Карева Е. Н., Олейникова О. М., Панов В. О., Шимановский Н. Л., Скворцова В. И.* Эстрогены и головной мозг // *Вестник РА МН*. 2012. № 2. С. 48–59.
3. *Rozen V. B.* Bases of endocrinology . Moscow: MGU, 1994. (in Russian).
4. *Sergeev P. V., Shimanovskii N. L., Petrov V. I.* Receptors to the physiologically active substances. Moscow-Volgograd, 1999. (in Russian).
5. *Baquedano M. Sl., Saraco N., Berensztein E., Pepe C., Bianchini M., Levy E., Goñi J., Rivarola M. A., Belgorosky A.* Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001. Vol. 86(5). P. 2258–2262.
6. *Felizola S. J. A., Nakamura Y., Hui X.-G., Satoh F., Morimoto R., McNamara K. M., Midorikawa S., Suzuki S., Rainey W. E., Sasano H.* Estrogen-related receptor α in normal adrenal cortex and adrenocortical tumors: involvement in development and oncogenesis // *Mol. Cell Endocrinol.* 2013. Vol. 365(2). P. 207–211.
7. *Felizola S. J. A., Nakamura Y., Hui X.-G., Satoh F., Morimoto R., Midorikawa S., Suzuki S., Rainey W. E. and Sasano H.* Estrogen-related receptor α in normal adrenal cortex and adrenocortical tumors: involvement in development and oncogenesis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 92(6). P. 2215–2222.