

УДК: 591.82:591.88

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.3.203

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ НЕЙРОГЕННОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫСЫ ПРИ СТАРЕНИИ

Чумасов Е. И.^{1,2*} – д-р. биол. н., проф. кафедры биологии, экологии, гистологии (ORCID 0000-0003-4859-6766), **Петрова Е. С.**² – ст. науч. сотр. отдела общей и частной морфологии (ORCID 0000-0003-0972-8658), **Коржевский Д. Э.**² – зав. отделом общей и частной морфологии (ORCID 0000-0002-2456-8165).

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

*ualct@mail.ru

Ключевые слова: эпикардальная жировая ткань крысы, старение, иннервация, нейровоспаление.

Keywords: rat epicardial adipose tissue, aging, innervation, neuroinflammation.

Поступила: 15.06.2023

Принята к публикации: 11.09.2023

Опубликована онлайн: 29.09.2023

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины.



РЕФЕРАТ

Целью настоящего исследования явилось изучение нейровоспалительного процесса в эпикардальной жировой ткани (ЭЖТ) крыс при старении. Работа выполнена на крысах Вистар в возрасте 18-23 мес ($n=18$). Для изучения иннервации ЭЖТ применяли нейроиммуногистохимические реакции на белок ПГП 9.5, тирозингидроксилазу, синаптофизин. Для исследования процессов воспаления использовали окраску толуидиновым синим и азуром-эозином. С помощью гистологических и иммуногистохимических методов в белой и бурой жировой ткани основания сердца старых крыс (18-23 мес) выявлены инволютивные и нейродегенеративные изменения парасимпатических и симпатических постганглионарных нервных волокон. В ЭЖТ выявлены признаки фиброза, дистрофические изменения и лизис белых адипоцитов, распад варикозных аксонов терминального нервного сплетения, а также образование очаговых моноцитарно-лимфоидных инфильтратов. Показано, что аксоны терминальной нервной сети находятся в тесных взаимоотношениях с иммунными и воспалительными клетками (лимфоцитами, плазмобластами, моноцитарно-макрофагальными элементами, тучными клетками и фибробластами). Перечисленные морфологические признаки свидетельствуют о нейрогенном типе иммунного воспаления в ЭЖТ. Выявленные изменения могут быть причиной хронического нарушения метаболизма липидов при старении, усугублять развитие патологических процессов в тканях магистральных сосудов аортально-пульмональной области сердца, а также служить прогностическими показателями для клинической практики.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Нейрогенное воспаление, возникающее в различных органах и тканях в результате местного высвобождения афферентными нейронами провоспалительных медиаторов, широко исследуется, начиная с середины прошлого века, до сегодняшнего дня [11, 13]. Установлена связь проявлений воспаления с такими нейропептидами, как субстанция Р, пептид CGRP и др. [13]. В нашей предыдущей работе был выявлен хронический характер нейрогенного воспаления в сердце крыс на поздних стадиях онтогенеза [10]. Малоизученным остается вопрос об изменении иннервации эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ) при патологии и старении [9]. Актуальность исследования жировой ткани животных связана с необходимостью изучения одной из важных медико-биологических проблем - «ожирением». Многими авторами подчеркивается значимость жировой ткани как полифункционального эндокринного органа [1-4]. В работах последних лет жировую ткань подразделяют на белую, бурую и «бежевую» [4, 6, 7]. Несмотря на большое число работ, посвященных изучению адипоцитов, вопросы, касающиеся иннервации белой и бурой жировых тканей, остаются малоизученными. В литературе имеются отдельные работы, в которых показано, что в подкожной жировой клетчатке и жировой ткани внутренних органов в нервных пучках, сопровождающих артериальные сосуды, имеются нервные волокна, иммунореактивные к нейропептиду Y, субстанции Р, пептиду CGRP, тирозингидроксилазе [8, 12]. Исследования, посвященные патологическим изменениям ЭЖТ и ее иннервации на поздних этапах онтогенеза, единичны [9]. Целью настоящего исследования явилось изучение нейровоспалительного процесса в эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ) крыс при старении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHOD

В работе использовали крыс-самцов Вистар в возрасте 18-23 мес ($n=18$). Об-

ектом исследования служила эпикардиальная жировая ткань крыс. Исследование проводили с соблюдением международных правил Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. Работа одобрена ЛЭК ФГБНУ «ИЭМ» (протокол №2/22 от 06.04.2022). Извлекали сердце крыс вместе с окологердечной областью, содержащей фрагменты магистральных кровеносных сосудов и ЭЖТ, материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле и заливали в парафин. На парафиновых срезах толщиной 5 мкм осуществляли иммуногистохимические (ИГХ) реакции. Для выявления белка ПГП 9.5 в холинергических проводниках использовали поликлональные кроличьи антитела («Spring Bioscience», США); для выявления синаптофизина (СФ) — поликлональные кроличьи антитела («MONOSAN», Нидерланды); для тирозингидроксилазы (ТГ) — поликлональные кроличьи антитела в разведении («Abcam», Великобритания). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора «Reveal Polyvalent HRP/ DAB Detection System kit» («SpringBioscience», США). Часть срезов окрашивали толуидиновым синим, азур-эозином и анилиновым синим. Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа «Leica DM 750» («Leica», Германия) и цифровой камеры «Leica ICC 50» («Leica», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Гистологический анализ препаратов, окрашенных толуидиновым синим, показал, что ЭЖТ представляет собой жировое депо, построенное из долек, состоящих из бурых и белых адипоцитов (рис. 1). Мы выделяем следующие три типа долек. Дольки, в которых преобладают кольцевидные адипоциты, соответствуют белой жировой ткани. Дольки, состоящие из клеток, сходных с эпителиальными, соответствуют бурой жировой ткани. В некоторых дольках могут присутствовать как те, так и другие клеточные элементы.

Такие дольки представлены смешанной жировой тканью (рис.1, 2).

Бурая жировая ткань представлена специализированными клетками — бурыми адипоцитами округлой или полигональной формы с центрально расположенным ядром и хорошо выраженной, заполненной многочисленными органеллами и сферическими вакуолярными пузырьками цитоплазмой. Адипоциты белой жировой ткани характеризуются кольцеобразной формой и имеют крупные размеры тела (50-75мкм). Цитоплазма их заполнена одной большой липидной вакуолью, состоящей из нейтральных

жиров — триглицеридов. Сильно уплощенные ядра их сдвинуты на самую периферию перикариона и окружены лишь узким ободком цитоплазмы. По нашим наблюдениям белая жировая ткань у половозрелых животных преобладает над бурой. Нередко встречаются дольки, состоящие из бурых и белых адипоцитов (смешанная жировая ткань) (рис. 1, 2).

В исследуемом материале стареющих и старых животных в ЭЖТ выявлены патологические изменения со стороны нервных структур. Показано, что наряду с дистрофическими и патологическими изменениями адипоцитов и нервных ап-

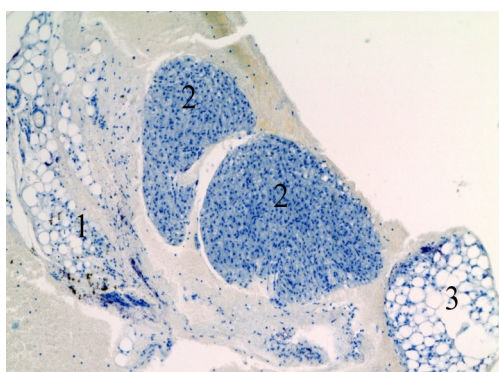


Рис. 1 – Общий вид долек ЭЖТ крысы в возрасте 18 месяцев (Толуидиновый синий, $\times 100$): 1 – смешанная жировая ткань; 2 – бурая жировая ткань; 3 – белая жировая ткань.

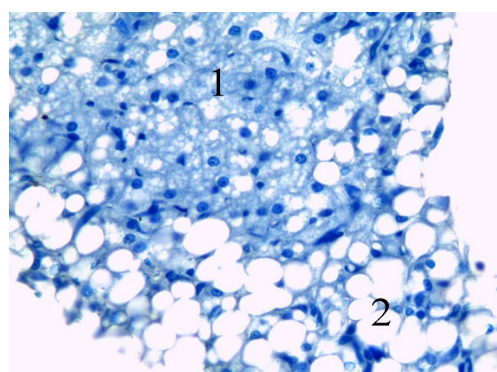


Рисунок - 2. Фрагмент эпикардальной жировой ткани крысы, на котором видны участки, отражающие процесс транскитодифференцировки бурых адипоцитов в белые (Толуидиновый синий, $\times 400$): 1 – бурая жировая ткань; 2 – белая жировая ткань.

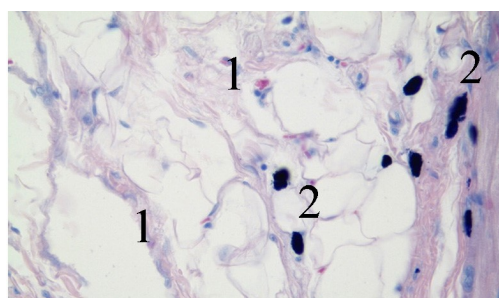


Рис. 3 – Воспалительные инфильтраты в ЭЖТ старой крысы (Азур-эозин, $\times 400$): 1 – фиброз; 2 – тучные клетки.

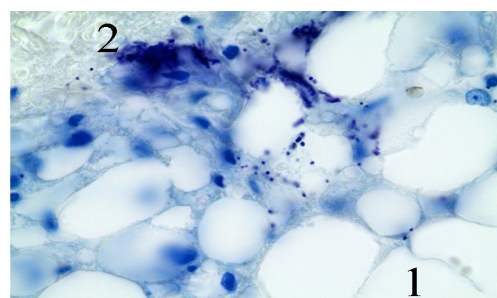


Рисунок – 4. Взаимоотношения тучных клеток с адипоцитами белой жировой ткани (Толуидиновый синий, $\times 1000$): 1 – белая жировая ткань; 2 – тучные клетки.

паратов в дольках ЭЖТ старых животных встречаются инфильтраты, состоящие из мононуклеарных лейкоцитов и тучных клеток (ТК) и признаки фиброза (рис. 3).

Скопления ТК часто располагаются в интерстициальной ткани между дольками, вблизи кровеносных сосудов, а также непосредственно между адипоцитами белой жировой ткани (рис. 4). Что касается бурой жировой ткани, в самих дольках ТК не встречаются, лишь иногда прилегают к ним (рис. 5). Выраженность фиброза в ЭЖТ старых животных также различается в разных ее частях. С помощью гистохимической окраски анилиновым

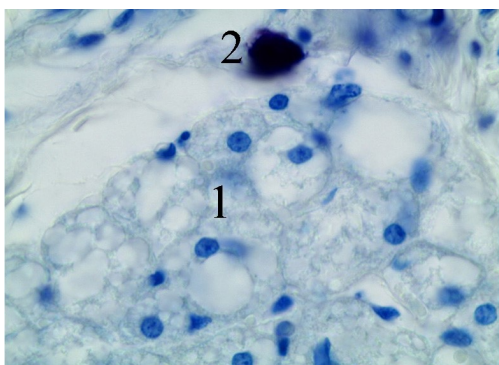


Рис. 5 – Взаимоотношения тучных клеток с адипоцитами бурой жировой ткани (Толуидиновый синий, $\times 1000$): 1 – бурая жирровая ткань; 2 – тучная клетка.

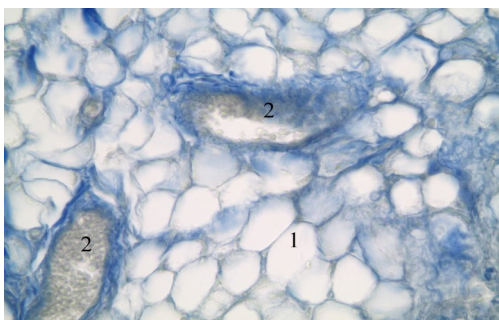


Рисунок 7. Фиброз в белой эпикардальной жировой ткани крысы при старении (Анилиновый синий, $\times 400$): 1 – белая жирровая ткань; 2 – кровеносные сосуды.

синим на коллаген показано, что в периваскулярных областях и интерстициальной ткани, локализуемой между дольками ЭЖТ, фиброз наиболее выражен (рис. 6, 7). Следует отметить, что в области бурой и смешанной жировой ткани коллагена встречается меньше, чем в области белой ЖТ. Отмечено, что кроме тучных клеток в ЭЖТ старых крыс увеличивается количество моноцитарно-макрофагальных элементов и плазмобластов. Присутствие в инфильтратах плазмобластов свидетельствует о хроническом процессе воспаления.

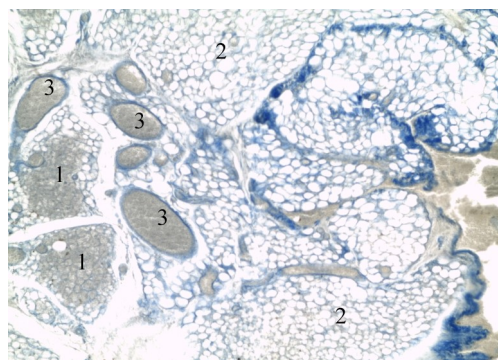


Рисунок - 6. Фиброз в эпикардальной жировой ткани крысы при старении (Анилиновый синий, $\times 100$): 1 – бурая жирровая ткань; 2 – белая жирровая ткань; 3 – кровеносные сосуды.

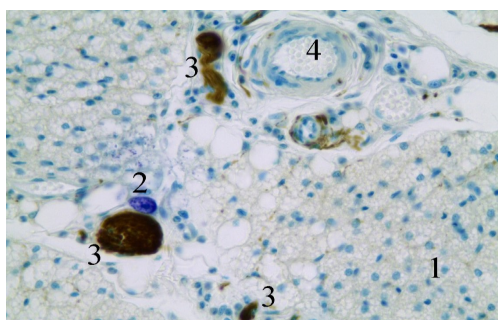


Рисунок - 8. Нервные аппараты в эпикардальной жировой ткани старых крыс (Иммуногистохимическая реакция на белок ПГП 9.5; толуидиновый синий, $\times 400$): 1 – бурые адипоциты; 2 – тучная клетка; 3 – нервные стволы; 4 – артерия.

ЭЖТ крыс хорошо васкуляризирована. С сосудистым руслом связаны нервные структуры. В ЭЖТ они различны по своей биохимической природе: встречаются парасимпатические нервные стволы, пучки, нервные сплетения из смешанных симпатических и парасимпатических нервных волокон (рис. 8).

С помощью применения ИГХ-реакции на белок ППП 9.5 можно видеть, что фрагменты артерий окружены периваскулярной сетью из тонких варикозных аксонов, так называемых синапсов типа *en passant*. Тончайшие ремаковские тяжи аксонов этой сети наблюдаются также вблизи адипоцитов в бурой и смешанной ЭЖТ. Более выраженная иннервация характерна для бурой ЭЖТ (рис. 9).

Известно, что нервные и иммунные регуляторные факторы играют решающую роль в развитии воспаления в тканях и органах животных [4]. В предыдущих работах нами отмечалось, что в онтогенезе крыс наблюдается общее снижение иннервации, особенно это касается симпатических нервных структур [10]. На

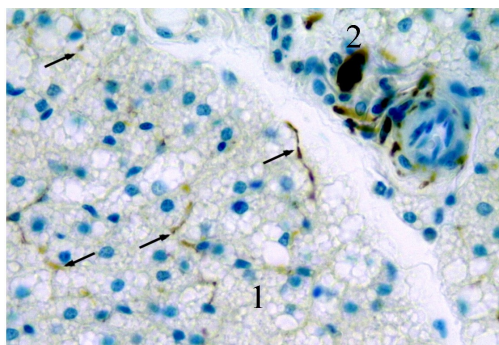


Рис. 9 – Нервные аппараты в области бурой эпикардальной жировой ткани старых крыс (Иммуногистохимическая реакция на белок ППП 9.5; толуидиновый синий, $\times 400$): стрелки – терминальные варикозные аксоны; 1 – бурые адипоциты; 2 – нервный ствол.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В настоящей работе, выполненной с применением гистологических и иммуногистохимических методов исследования, в ЭЖТ крыс Вистар при старении обнару-

срезах бурой и белой ЭЖТ видны фрагменты терминального нервного сплетения, которое локализовано в основном вокруг стенок сосудов. Сравнительный анализ ИГХ-реакции на ППП 9.5 и ТГ подтвердил, что у старых крыс преобладает парасимпатическое звено автономной нервной системы над симпатическим. Плотность катехоламинергических ТГ⁺ терминальных структур меньше, чем ППП 9.5+ (рис. 10).

Обнаруженные картины дегенерации симпатических и парасимпатических нервных аппаратов в смешанных долях ЭЖТ, дистрофические изменения белых адипоцитов, а также наличие в этих участках тучных клеток и лимфоидно-моноцитарных инфильтратов являются показателями развития нейрогенного воспаления в жировой ткани сердца старых крыс. Полученный факт дополняет данные нашего предыдущего исследования, в котором описаны картины нейрогенного воспаления в области миокарда сердца крыс при старении [10].

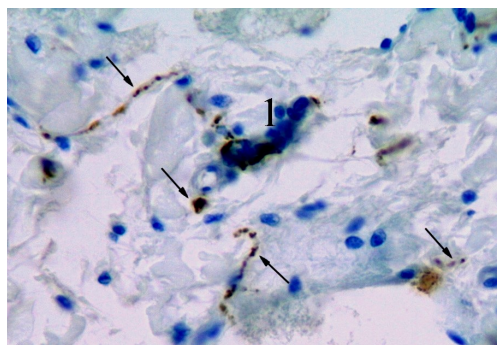


Рис. 10 – Фрагментация симпатических нервных терминалей и наличие воспалительных инфильтратов в ЭЖТ старых крыс (Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу, докраска толуидиновым синим, $\times 400$): стрелки – ТГ⁺ терминали; 1 – очаги Т- и В-лимфоцитов.

жены очаговые воспалительные инфильтраты, связанные с нервными структурами, селективно выявляющимися с помощью нейроиммуногистохимических маркеров. Установлены тесные взаимоотно-

шения аксонов терминальной нервной сети с кровеносными сосудами, адипоцитами, клетками воспалительных инфильтратов (лимфоцитами, моноцитами, тучными клетками). Выявленные морфологические признаки инволютивных и дегенеративных изменений нервных структур, а также наличие иммуно-воспалительных клеточных и тканевых реакций, укладываются в описание нейрогенного воспаления. Таким образом, при старении у лабораторных животных в ЭЖТ наблюдаются проявления нейрогенного воспаления. Выявленные изменения могут быть причиной хронического нарушения метаболизма и прогрессии патологических процессов в тканях магистральных сосудов аортально-пульмональной области сердца.

MORPHOLOGICAL SIGNS OF NEUROGENIC INFLAMMATION IN RAT EPICARDIAL ADIPOSE TISSUE DURING AGING

Chumasov E.I.^{1,2} – Doctor of Biology, Professor of the Department of Biology, Ecology, Histology, **Petrova E.S.**² – Senior researcher of the Department of General and Private Morphology, **Korzhevsky D.E.**² – Head, department of general and private morphology

¹ St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

² Institute of Experimental Medicine

*ua1ct@mail.ru

ABSTRACT

The aim of this work is to study the neuroinflammatory process in the epicardial adipose tissue (EAT) of the aortic-pulmonary region of the rat heart during aging. The work was performed on Wistar rats aged 18-23 months (n=18). The adipose tissue of the pericardial region of rats was the object of study. Neuroimmunohistochemical markers (9.5 protein, tyrosine hydroxylase, synaptophysin) were used to study EAT innervation. The method of staining with toluidine blue and azure-eosin was used to study inflammation processes. Using histological and immunohistochemical meth-

ods, involutive and neurodegenerative changes in parasympathetic and sympathetic postganglionic nerve fibers were revealed in the white and brown adipose tissue of the heart of old rats (18-23 months old). A number of pathological changes were revealed in EAT: fibrosis, dystrophic changes and lysis of white adipocytes, disintegration of varicose axons of the terminal nerve plexus, as well as the formation of focal monocytic-lymphoid infiltrates. It has been shown that the axons of the terminal nervous network are in close relationship with immune and inflammatory cells (lymphocytes, plasmablasts, monocyte-macrophage elements, mast cells). The noted morphological features indicate a neurogenic type of immune inflammation in the EAT of the heart. The identified changes may be the cause of chronic disorders of lipid metabolism during aging, leading to the development of pathological processes in the tissues of the main vessels of the aortic-pulmonary region of the heart, and also serve as prognostic indicators for clinical practice.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Афанасьев Ю.И. Бурая жировая ткань / Ю.И. Афанасьев, Е.Д. Колодезникова. - Иркутск: ИГУ, 1995. – 180с.
2. Воротников А.В. Латентное воспаление и нарушение обновления жировых депо как механизм развития резистентности к инсулину при ожирении / А.В. Воротников, Ю.С. Стафеев, М.Ю. Меньшиков [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 11. – С. 1649-1667. DOI: 10.1134/S0320972519110095
3. Дедов И.И.. Жировая ткань как эндокринный орган / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко, С.А. Бутрова // Ожирение и метаболизм. – 2006. – Т. 1. – С. 7-13.
4. Дылева Ю.А. Ожирение и старение. Общие аспекты / Ю.А. Дылева, Е.В. Белик, О.В. Груздева // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2023. – Т.109. – № 3. – С. 267-282. DOI: 10.31857/S0869813923030020
5. Корнева Е.А. Взаимодействие нервной и иммунной систем / Е.А. Корнева, Н.С. Новикова, К.З. Шаинидзе, С.В. Пе-

рекрест // Молекулярно-клеточные аспекты. СПб.: Наука, 2012. – 173с.

6. Учасова Е.Г. Эпикардальная жировая ткань: патофизиология и роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний / Е.Г. Учасова, О.В. Груздева, Ю.А. Дылева, О.Е. Акбашева // Бюлл. сибирской мед. – 2018. – Т. 17. – № 4. – С. 254-263. DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-254-263

7. Bartness TJ, Ryu V. Neural control of white, beige and brown adipocytes // Int. J. Obesity Suppl. – 2015. – Vol. 5: S35. DOI: 10.1038/ijosup.2015.9

Chi J, Lin Z, Barr W, Zhu XG, Cohen P. Early postnatal interactions between beige adipocytes and sympathetic neurites regulate innervation of subcutaneous fat // Elife. 2021. Vol. 10: e64693. DOI: 10.7554/eLife.64693

8. Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii D.E. Peculiarities of the innervation of epicardial adipose tissue in a rat with aging (immunohistochemical study) // Advanc Gerontol. – 2022. – Vol. 12. – № 3. – P. 310-316. DOI: 10.1134/S2079057022030055

9. Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii DE. Morphological Signs of Neurogenic Inflammation in the Heart of Rats during Aging // Advances in Gerontology. 2022. – Vol. 12. – № 2. – P.112–120. DOI: 10.1134/S2079057022020059

10. Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation // BJU Int. 2008. – Vol. 101. – № 3. – P. 2-6. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2008.07493.x.

11. Giordano A, Morroni M, Santone G, Marchesi GF, Cinti S. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation // J. Neurocytol. 1996. – Vol. 25. – № 2. – P. 125-136. DOI: 10.1007/BF02284791.

12. Sousa-Valente J, Brain S D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation // Seminars Immunopathol. – 2018. – Vol. 40. – P. 229-236. DOI: 10.1007/s00281-018-0673-1.

REFERENCES

1. Afanas'ev YU.I., Kolodeznikova E.D. Buraya zhirovaya tkan'. Irkutsk: IGU; 1995. – 180s. (In Russ.)

2. Vorotnikov A.V., Stafeev YU.S., Men'shikov M.YU., Shestakova M.V., Parfenova E.V. Latentnoe vospalenie i narushenie obnovleniya zhirovyyh depo kak mekhanizm razvitiya rezistentnosti k insulinu pri ozhirennii. Biohimiya. 2019; 84 (11): 1649-1667. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0320972519110095

3. Dedov I.I., Mel'nichenko G.A., Butrova S.A. Zhirovaya tkan' kak endokrinnyy organ. Ozhirenie i metabolizm. 2006; 1: 7-13. (In Russ.)

4. Dyleva YU.A., Belik E.V., Gruzdeva O.V. Ozhirenie i starenie. Obshchie aspekty. Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova. 2023; 109(3): 267-282. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0869813923030020

5. Korneva E.A., Novikova N.S., Shainidze K.Z., Perekrest S.V. Vzaimodejstvie nervnoj i immunnoj sistem. Molekulyarno-kletochnye aspekty. SPb.: Nauka, 2012. – 173s. (In Russ.)

6. Uchasova E.G., Gruzdeva O.V., Dyleva YU.A., Akbasheva O.E. Epikardial'naya zhirovaya tkan': patofiziologiya i rol' v razvitiy serdechno-sosudistyyh zabolevanij. Byull. sibirskoj med. 2018; 17(4): 254-263. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2018-4-254-263

7. Bartness T.J., Ryu V.. Neural control of white, beige and brown adipocytes. Int. J. Obesity Suppl. 2015; 5: 35. DOI: 10.1038/ijosup.2015.9

8. Chi J., Lin Z., Barr W., Zhu X.G., Cohen P. Early postnatal interactions between beige adipocytes and sympathetic neurites regulate innervation of subcutaneous fat. Elife. 2021; 10: e64693. DOI: 10.7554/eLife.64693

9. Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Peculiarities of the innervation of epicardial adipose tissue in a rat with aging (immunohistochemical study). Advanc Gerontol. 2022; 12(3): 310-316. DOI: 10.1134/S2079057022030055

10. Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Morphological Signs of Neurogen-

ic Inflammation in the Heart of Rats during Aging. *Advances in Gerontology*. 2022; 12 (2): 112–120. DOI: 10.1134/S2079057022020059

11. Geppetti P., Nassini R., Materazzi S., Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int*. 2008; 101(3): 2-6. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2008.07493.x.

12. Giordano A., Morroni M., Santone G. Marchesi GF, Cinti S. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calciton-

in gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation. *J. Neurocytol*. 1996; 25(2): 125-136. DOI: 10.1007/BF02284791.

13. Sousa-Valente J., Brain S.D. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. *Seminars Immunopathol*. 2018; 40: 229-236. DOI: 10.1007/s00281-018-0673-1.