

© Коллектив авторов, 2017

УДК 611.8-008.615:611.41:612.65:599.323.4

*М.Ю.Капитонова¹, С.Б.Фуад¹, С.Л.Кузнецов², С.С.Дыдыкин²,
Д.А.Чернов², М.Н.К.Нор-Ашикин¹, А.Ахмад¹*

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ В БЕЛОЙ ПУЛЬПЕ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГЕТЕРОТИПИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

¹ Кафедра анатомии (зав. — д-р мед. наук С.Б.Фуад), медицинский факультет Технологического университета МАРА, Селангор, Малайзия; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — чл.-кор. РАН С.Л.Кузнецов), ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова»

Проведена сравнительная иммуногистохимическая оценка хронического действия гетеротипических стрессоров на селезенку у неполовозрелых крыс Спрейг-Дуоли (n=48) в разные возрастные периоды (инфантильный и перипубертатный периоды онтогенеза). На гистологических срезах селезенки проводили иммуногистохимические реакции на маркеры дендритных и лимфоидных клеток, пролиферации и апоптоза с последующим анализом изображения. Исследование показало, что в инфантильном возрасте снижение морфометрических показателей популяций как Т- (CD4, CD8, CD90), так и В-клеток (CD20) в селезенке больше, чем в перипубертатном; при этом у животных обеих возрастных групп оно значительнее при действии гетеротипического стрессора, чем гомотипического. Численность ОХ62-позитивных дендритных клеток при стрессе значимо снижалась лишь у животных перипубертатного возраста, а различия по данному показателю между двумя группами стрессоров были незначительными, в то время как уменьшение содержания дендритных клеток имело место в обеих возрастных группах, с существенными различиями между двумя типами стрессоров. Таким образом, иммуноморфологические изменения селезенки, вызванные гетеротипическим стрессом, отличаются по своим возрастным особенностям от индуцированных гомотипическим стрессом. Это, вероятно, связано с различиями в особенностях активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси у неполовозрелых животных разных возрастных групп при действии различных типов стресса.

Ключевые слова: селезенка, стресс, ранний постнатальный период онтогенеза, иммуногистохимия, анализ изображения

Широкий диапазон иммуномодулирующих действий стресса от стимулирующего до глубокого угнетающего на иммунную систему организма человека и экспериментальных животных обнаружен в многочисленных исследованиях последних лет [7, 16]. Вектор стресс-ассоциированной иммуномодуляции зависит от многих факторов, как внешних, так и внутренних, среди которых ведущими внешними считаются продолжительность и тип стрессорного воздействия, а внутренними — возраст, пол испытуемого, тип приспособительного поведения и предыдущий опыт стрессорных экспозиций [6, 10]. Известно, что почти все клеточные элементы, участвующие во врожденном и приобретенном иммунитете, подвержены возрастному ремоделированию [18]. Действие на организм любых иммуномодулирующих фак-

торов, в том числе таких, как хронический стресс, во время активного роста способствует наложению возрастных изменений на индуцированные, что может оказать значительное воздействие на иммунный ответ. Принято считать, что хронический стресс является иммунодепрессивным, однако механизмы иммуносупрессии по-прежнему нуждаются в дальнейшем изучении, что даст возможность разрабатывать адресные биоповеденческие рекомендации или фармакологические методики, направленные на минимизацию иммуносупрессивных последствий стресса с целью укрепления здоровья и ускорения выздоровления [2, 13, 15].

В последнее время появились целый ряд работ, посвященных изучению влияния хронического гетеротипического стресса, т. е. стрессорного

Сведения об авторах:

Капитонова Марина Юрьевна (e-mail: marinakapitonova@mail.ru), Фуад Саед Бахаром Саед Ахмад (e-mail: sbsaf11@gmail.com), Ахмад Азхар (e-mail: biotech.azhar@gmail.com), кафедра анатомии, UiTM Medical and Dental campus, Jalan Hospital, Sungai Buloh 47000, Selangor, Malaysia; Нор-Ашикин Мохд Нур Кхан (e-mail: noras011@salam.uitm.edu.my), кафедра физиологии, Science and Technology Campus, Section 1, Shah Alam 40150, Malaysia; медицинский факультет Технологического университета МАРА, Селангор, Малайзия

Кузнецов Сергей Львович (e-mail: vakmedbiol@rambler.ru), Чернов Дмитрий Александрович (e-mail: blackdi85@yandex.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Дыдыкин Сергей Сергеевич (e-mail: dydykin_ss@mail.ru), кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, 125009, Москва, ул. Моховая, 11, с. 10

воздействия с меняющимся стрессором, которое чаще всего влияет на организм современного человека [3, 14], затрагивая главным образом нейроэндокринную систему. Продemonстрировано, что активация гипоталамо-гипофизарно-адрено-кортикальной оси при повторном действии гомотипического стресса снижается, а гетеротипического, напротив, усиливается [11]. Влияние гетеротипического стресса на иммунную систему растущего организма, в частности на морфологические особенности иммунных органов, остается практически неизученным.

Цель данного исследования — сравнительная оценка иммуномодулирующего действия стресса на строение селезенки при действии гомо- и гетеротипических стрессоров в различные возрастные периоды у крыс до наступления половой зрелости.

Материал и методы. Протокол исследования одобрен этическим комитетом научных исследований с использованием экспериментальных животных медицинского факультета Университета Технологии МАРА, протокол ACUC 4–11 от 14.04.2011 г. Исследование выполнено на 48 крысах породы Спрег-Дули в возрасте 20 и 45 сут, что соответствовало инфантильному и перипубертатному периодам постнатального развития. На момент окончания эксперимента возраст был 28 и 53 сут соответственно [17]. В каждой возрастной группе, включающей 24 особи, животных подразделяли на 3 подгруппы: контрольную и 2 экспериментальные для моделирования [5] хронического гомотипического и гетеротипического стресса. В качестве гомотипического стрессорного воздействия применялся стресс «избегания воды», а в качестве гетеротипического — использовалась непредсказуемая последовательность действия трех стрессоров: «избегания воды», водной иммерсии и иммобилизации при температуре 4 °C. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре +20...20 °C с доступом к воде и пище *ad libitum*. Экспериментальных животных ежедневно на протяжении 9 сут по 2 ч в день, начиная с 9 ч утра, подвергали стрессорному воздействию, в то время как животные групп возрастного контроля находились вне аудио- и видеодоступности от экспериментальных животных. После последнего сеанса стресса животных под анестезией декапитировали, селезенку извлекали, фиксировали формалином и заливали в парафин.

Гистологические срезы селезенки окрашивали гематоксилином — эозином и иммуногистохимически поликлональными антителами к белку S100 (Дако, Дания, Z0311), а также моноклональными антителами к PCNA (клон PC10) — ядерного антигена пролиферирующих клеток (AbDSerotec, США, MCA1558); CD4 (клон W3/25) — маркеру Т-хелперов и тимоцитов (AbDSerotec, США, MCA55); CD8 (клон MRC OX8) — маркеру тимоцитов, Т-клеток и NK-клеток (AbDSerotec, США, MCA48), CD90 (клон HIS51) — маркеру тимоцитов, недавних тимусных иммигрантов (BD Biosciences, #550570), каспазы-3 — маркеру апоптоза (AbDSerotec, США, #АНР476), OX62 (клон MRC OX62) — маркеру дендритных клеток (AbDSerotec, США, MCA1029); CD20 (клон R1N-9D3) — маркеру пре- и зрелых В-лимфоцитов (AbDSerotec, MCA#1432).

Для визуализации применяли стрептавидин-биотин-пероксидазный метод по стандартным методикам в соответствии с рекомендациями производителей реактивов. Удельные площади иммунопозитивных клеток, окрашенных диаминобензидином в коричневый цвет, оценивали морфометрически с применением программы Image-Pro+ 8.0 (Media Cybernetics, США), транспортирующей цифровые данные в программу Excel. Определяли среднюю арифметическую величину, среднееквадратическое отклонение, ошибку репрезентативности. Оценку значимости различий сравниваемых величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости считали $P < 0,05$.

Результаты исследования. Хронический стресс при действии как гомо-, так и гетеротипических стрессоров вызывал микроскопические изменения в селезенке. Они заключались в уменьшении объема Т- и В-зон белой пульпы, маргинальной зоны вокруг них, снижении плотности расположения клеток как в Т-зонах (периартериальные лимфоидные влаглища), так и в В-зонах (лимфоидные узелки), а также увеличении в них количества макрофагов с неокрашенной цитоплазмой, захвативших апоптозные тельца. Иммуногистохимическая реакция на различные группы дендритных клеток, лимфоцитов и клеток, гибнущих путем апоптоза (*рис. 1*), показала влияние обоих видов стресса на динамику данных клеточных популяций. Хронический стресс, как гомо-, так и гетеротипический, вызывал значимое уменьшение удельной площади как Т-, так и В-клеточных популяций в обеих возрастных подгруппах, причем при действии гетеротипических стрессоров это снижение было более выраженным, с неодинаковым уровнем значимости различий в экспериментальных группах у отдельных субпопуляций лимфоцитов (*рис. 2, а–г*). Доля CD8⁺- и CD4⁺-лимфоцитов снижалась значимо в обеих экспериментальных группах с большим уровнем различий у животных перипубертатного возраста, чем инфантильного (см. *рис. 2 а, в*). Количество CD90⁺- и CD20⁺-лимфоцитов уменьшилось значительно у инфантильных животных, чем в перипубертатном возрасте. При гетеротипическом стрессе в обеих возрастных группах снижение данного показателя было более выраженным (см. *рис. 2, в, г*).

Хронический стресс оказывал также влияние на возрастную динамику двух популяций стромальных клеток: OX-62- и белок S100-иммунопозитивных. У инфантильных животных число OX-62⁺-клеток при стрессе менялось незначительно, в то время как у крыс перипубертатного возраста оно значимо снижалось при действии обоих видов стрессоров с минимальными различиями между двумя экспериментальными

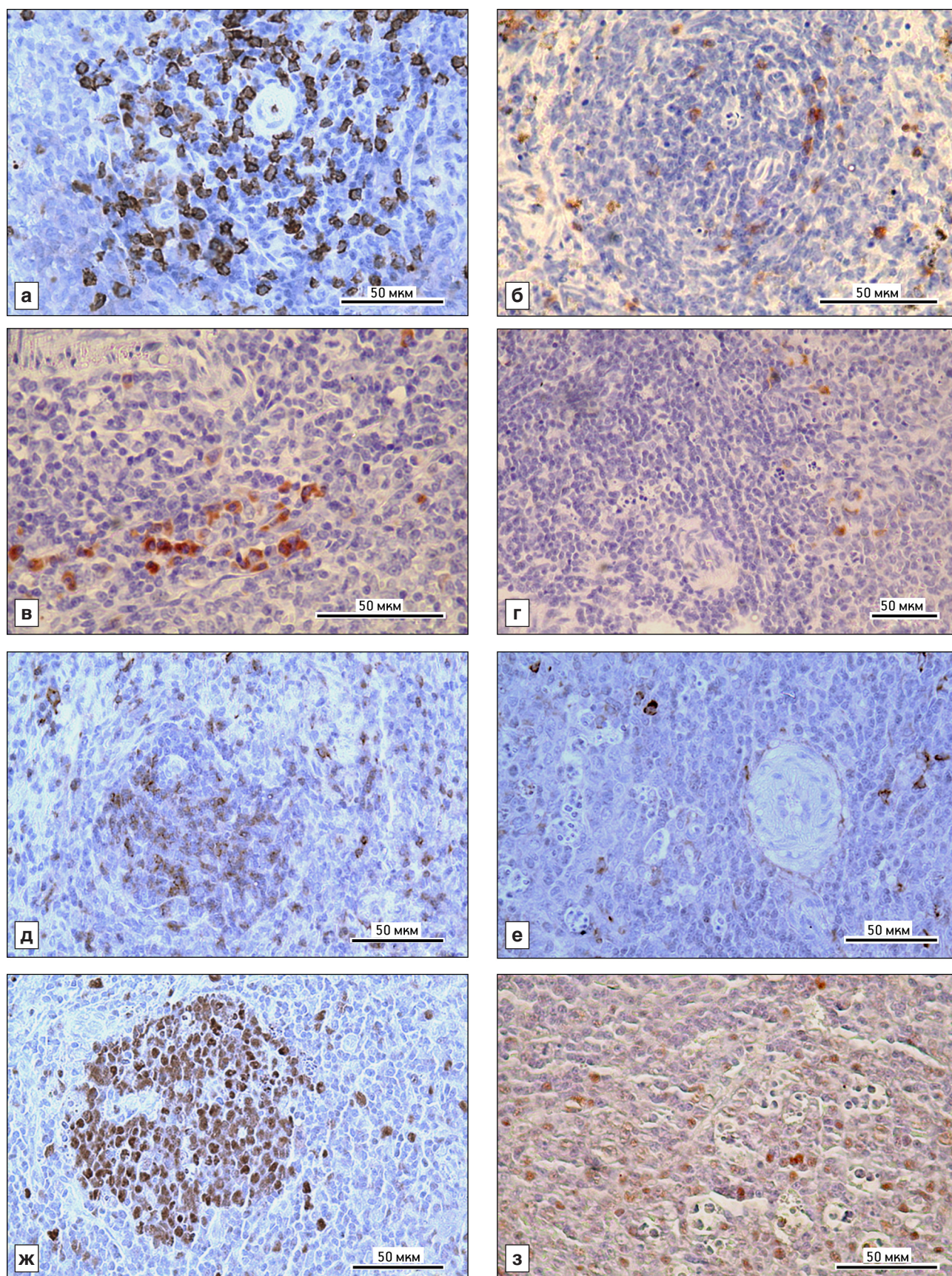


Рис. 1. Селезенка крыс перипубертатной (а—г, ж, з) и инфантильной (д, е) возрастных групп в контроле (а, в, д, ж) и после гомотипического (б) и гетеротипического (г, е, з) стресса.

а, б — реакция на CD8; в, г — реакция на CD90; д, е — реакция на OX-62; ж, з — реакция на PCNA. После всех реакций докраска гематоксилином

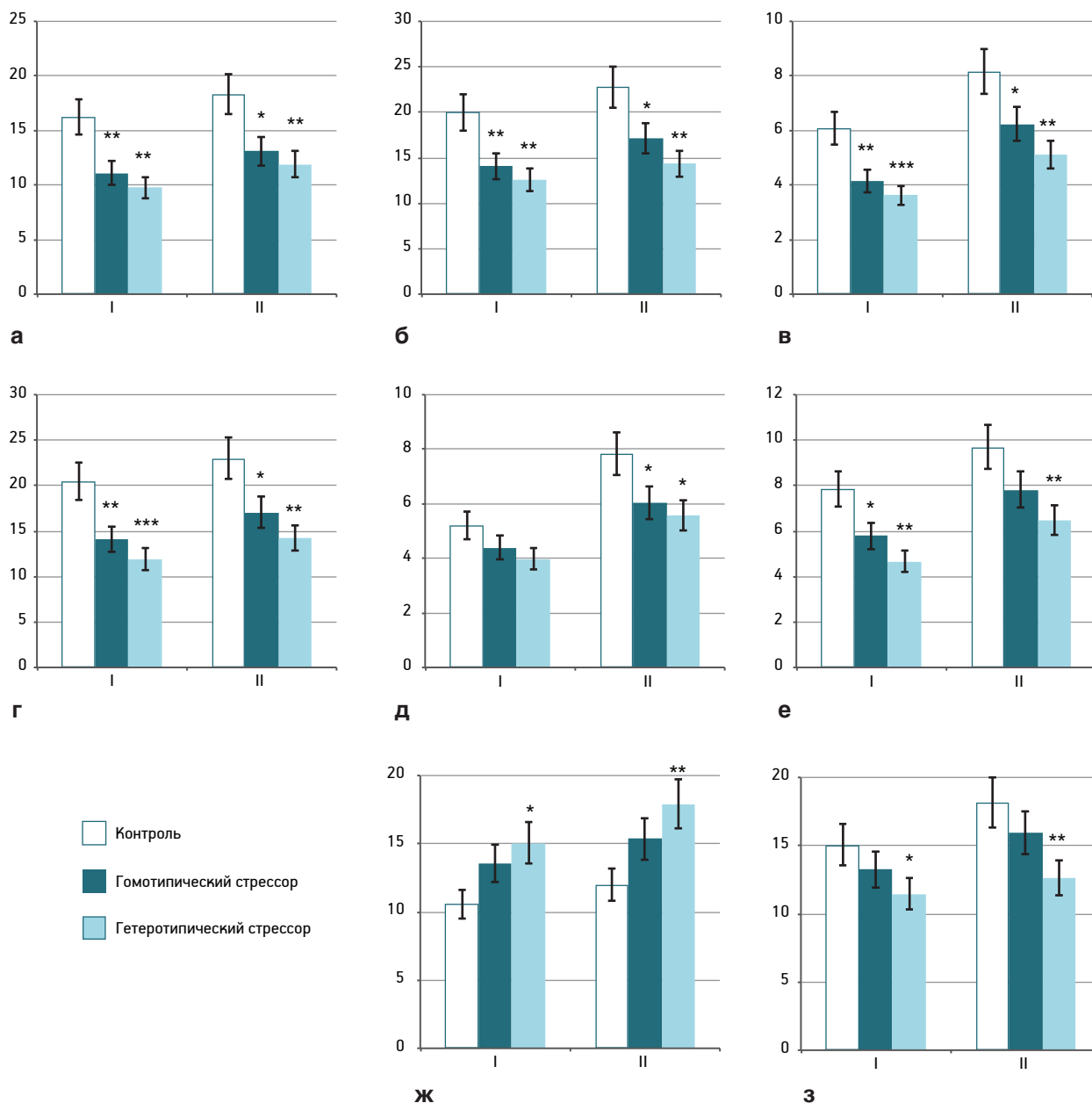


Рис. 2. Удельная площадь различных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

а — CD4⁺-иммунореактивные клетки; б — CD8⁺-иммунореактивные клетки; в — CD20⁺-иммунореактивные клетки; г — CD90⁺-иммунореактивные клетки; д — OX62⁺-иммунореактивные клетки; е — белок S100⁺-иммунореактивные клетки; ж — каспаза-3-иммунореактивные клетки; з — PCNA⁺-иммунореактивные клетки. По горизонтальной оси: I — инфантильный возраст; II — перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$; *** при $P < 0,001$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

ми группами (см. рис. 2, д). Удельная площадь фолликулярных дендритных клеток имела другую динамику: при гомотипическом стрессе она значимо снижалась лишь у животных инфантильного возраста, в то время как при гетеротипическом стрессе — в обеих возрастных группах, причем с бóльшим уровнем значимости, чем при гомотипическом стрессе (см. рис. 2, е). Для

выяснения механизмов стресс-ассоциированной динамики популяций лимфоидных и дендритных клеток был проведен анализ содержания PCNA- и каспаза-3-иммунопозитивных клеток. Оказалось, что удельная площадь клеток, несущих маркер апоптоза, значимо увеличивается в обеих возрастных группах лишь при гетеротипическом стрессе, причем с бóльшим уровнем

нем значимости у животных в перипубертатном возрасте (см. рис. 2, ж). Содержание PCNA-иммунопозитивных клеток при действии гомотипического стресса у животных обеих возрастных подгрупп изменялось незначительно, а в то время как при гетеротипическом стрессе значимо снижалось (см. рис. 2, з).

Обсуждение полученных данных. В литературе имеются данные о действии различных по силе («мягкий» и «жесткий»), характеру (системный или процессивный) гомотипических стрессоров на иммунную систему растущего организма [1, 12]. Однако сведений о влиянии гетеротипических стрессоров на лимфоидные органы весьма немного. В единичных исследованиях, посвященных адаптационным процессам при гетеротипическом стрессе в растущем организме, представлены в основном нарушения в нейроэндокринной и сердечно-сосудистой системе, в то время как исследования иммунных органов ограничиваются данными о массе тимуса [4, 8, 9]. Нами показано, что изменения, затрагивающие популяции лимфоидных и стромальных клеток в селезенке, а также интенсивность пролиферации и апоптоза иммуноцитов в различные периоды раннего постнатального онтогенеза при хроническом действии гетеротипических стрессоров, различаются и превосходят по значимости изменения при гомотипическом стрессе. Применение иммуногистохимических методов исследования и имидж-анализа позволяет выявить динамику стресс-ассоциированных изменений в селезенке у экспериментальных животных и продемонстрировать возрастные различия реакций на действие гомо- и гетеротипических стрессоров в двух возрастных группах у крыс.

Исследование показало, что изменения в селезенке растущего организма при хроническом действии гомо- и гетеротипических стрессоров различаются по динамике клеточных популяций лимфоцитов и дендритных клеток, уровнями апоптоза и пролиферации клеток в ее Т- и В-зонах. По нашим данным, диапазон этих различий связан с возрастными особенностями активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси при хроническом стрессе. Полученные данные демонстрируют, что нейроэндокринные и иммунные изменения, опосредованные различными видами стресса (гомо- или гетеротипического), накладываются на сложные возрастные перестройки органов иммунной и эндокринной систем, наблюдаемые до наступления половой зрелости, что формирует различные иммуномодуляционные изменения при гомо- и гетеротипическом стрессе на раз-

ных этапах раннего постнатального онтогенеза. Полученные данные могут использоваться при разработке адресных мер профилактики иммуносупрессивных нарушений в растущем организме, пережившем хроническое действие гомо- или гетеротипических стрессоров.

Таким образом, использование морфологических методов исследования позволяет не только констатировать наличие изменений в различных популяциях иммуноцитов под влиянием стрессоров, но локализовать их по отделам лимфоидных органов. Проведенное нами исследование показало наличие иммуносупрессивных изменений в селезенке у неполовозрелых крыс, состав и выраженность которых различались у животных разных возрастных групп (инфантильного и перипубертатного возраста) при хроническом действии гетеротипических стрессоров по сравнению с гомотипическим стрессом.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки, технологии и инноваций Малайзии 600-RMI/ST/FRGS 5/3/Fst (182–2010).

ЛИТЕРАТУРА

1. Капитонова М.Ю., Кузнецов С.Л., Фуад С.Б.С.А. и др. Иммуногистохимическая характеристика селезенки при действии различных видов стрессоров // Морфология. 2009. Т. 136, вып. 5. С. 61–66.
2. Ahmad S.F., Zoheir K.M., Ansari M.A. et al. Stimulation of the histamine 4 receptor with 4-methylhistamine modulates the effects of chronic stress on the Th1/Th2 cytokine balance // Immunobiology. 2015. Vol. 220, № 7. P. 889–898.
3. Babb J.A., Masini C.V., Day H.E., Campeau S. Habituation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones to repeated homotypic stress and subsequent heterotypic stressor exposure in male and female rats // Stress. 2014. Vol. 17, № 3. P. 224–234.
4. Chauhan E., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. Pharmacological investigations on cross adaptation in mice subjected to stress immobilization // Life Sci. 2015. Vol. 15, № 127. P. 98–105.
5. Choudhury B.K., Shi X.Z., Sarna S.K. Norepinephrine mediates the transcriptional effects of heterotypic chronic stress on colonic motor function // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2009. Vol. 296, № 6. P. 1238–1247.
6. Costa-Pinto F.A., Palermo-Neto J. Neuroimmune interactions in stress // Neuroimmunomodulation. 2010. Vol. 17, № 3. P. 196–199.
7. Dhabhar F.S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful // Immunol. Res. 2014. Vol. 58, № 2–3. P. 193–210.
8. Duarte J.O., Cruz F.C., Leão R.M. et al. Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats // Psychosom. Med. 2015. Vol. 77, № 2. P. 186–199.
9. Duarte J.O., Planeta C.S., Crestani C.C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardio-

- vascular function: comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2015. Vol. 40. P. 52–59.
10. Gądek-Michalska A., Tadeusz J., Rachwalska P., Bugajski J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems // *Pharmacol. Rep.* 2013. Vol. 65, № 6. P. 1655–1662.
 11. Gagliano H., Nadal R., Armario A. Sex differences in the long-lasting effects of a single exposure to immobilization stress in rats // *Horm. Behav.* 2014. Vol. 66, № 5. P. 793–801.
 12. Groër M.W., Hill J., Wilkinson J.E., Stuart A. Effects of separation and separation with supplemental stroking in balb/c infant mice // *Biol. Res. Nurs.* 2002. Vol. 3, № 3. P. 119–131.
 13. Hu D., Wan L., Chen M. et al. Essential role of IL-10/STAT3 in chronic stress-induced immune suppression // *Brain Behav. Immunol.* 2014. Vol. 6. P. 118–127.
 14. Kopp B.L., Wick D., Herman J.P. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex // *Physiol. Behav.* 2013. Vol. 122. P. 246–252.
 15. Li H., Zhao J., Chen M. et al. Toll-like receptor 9 is required for chronic stress-induced immune suppression // *Neuroimmunomodulation.* 2014. Vol. 21, № 1. P. 1–7.
 16. Marques A.H., Bjørke-Monsen A.L., Teixeira A., Silverman M.N. Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology // *Brain Res.* 2015. Vol. 1617. P. 28–46.
 17. Parker G.A., Picut C.A. Atlas of histology of the juvenile rat. London: Elsevier, 2016.
 18. Stojić-Vukanić Z., Bufan B., Arsenović-Ranin N. et al. Aging affects AO rat splenic conventional dendritic cell subset composition, cytokine synthesis and T-helper polarizing capacity // *Biogerontology.* 2013. Vol. 14, № 4. P. 443–459.

Поступила в редакцию 14.03.2017
Получена после доработки 25.04.2017

AGE-RELATED PATTERNS OF CHANGES IN THE SPLENIC WHITE PULP IN HETEROTYPIC STRESS: EXPERIMENTAL IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

*M.Yu. Kapitonova¹, S.B. Fuad¹, S.L. Kuznetsov²,
S.S. Dydykin², D.A. Chernov², M.N.K. Nor-Ashikin¹,
A. Ahmad¹*

The effect of exposure to chronic heterotypic stress on the spleen was studied in Sprague-Dawley rats (n=48) of different age groups (infantile and peripuberal periods of ontogenesis) using immunohistochemical methods. Immunohistochemical reactions were performed on histological sections of the spleen using the antibodies against markers of lymphoid and dendritic cells, proliferation and apoptosis, with subsequent image analysis. The study demonstrated that in the infantile heterotypically stressed animals the morphometric parameters of populations of both T- (CD4+, CD8+, CD90+) and B-cells (CD20+) in the spleen were reduced more than in the peripuberal rats. In both age groups this reduction was more significant in heterotypic stress group compared to the homotypic stress-exposed animals. The number of the OX-62+ dendritic cells decreased only in the peripubertal rats exposed to stress, with insignificant differences between homo- and heterotypic stress groups, while the number of the follicular dendritic cells was reduced in both ages with significant differences between homo- and heterotypically stressed groups. Thus, heterotypic stress-induced immunomorphological changes in the spleen have different age-related pattern compared to those induced by the homotypic stress. This may be associated with diverse hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis activation patterns in immature animals of various age groups exposed to different types of stress.

Key words: *spleen, stress, early postnatal development, immunohistochemistry, image analysis*

¹ Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Sugai Buloh campus, Universiti Teknologi MARA, Selangor, Malaysia;

² Department of Histology, Cytology and Embryology, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University