

© Коллектив авторов, 2009
УДК 616.441:616.8-008.615:599.323.4

*М.Ю. Капитонова^{1,3}, С.Л. Кузнецов², С.Б.С.А. Фуад¹, Ю.В. Дегтярь⁴, В.В. Хлебников³,
А.А. Нестерова³ и Д.А. Чернов³*

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССОРОВ

¹ Медицинский факультет (декан — проф. Кхалид Юсофф) Международного Технологического университета МАРА, Шах Аллам, Малайзия; ² кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. С.Л. Кузнецов) Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова; ³ кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — проф. М.Ю. Капитонова) и ⁴ кафедра судебной медицины (зав. — доц. В.Б. Барканов) Волгоградского государственного медицинского университета

Произведена оценка изменений иммуноархитектоники селезенки неполовозрелых белых крыс-самцов линии Sprague-Dawley под воздействием стрессоров различного типа (физического и психо-эмоционального) с помощью количественных иммуногистохимических методов. Животных в возрасте 1 мес подвергали действию хронического стресса ежедневно по 5 ч в течение 7 сут. По окончании последнего сеанса стрессового воздействия крыс декапитировали, селезенку извлекали, взвешивали и исследовали с помощью гистологических методов и иммуногистохимических реакций выявления CD3, CD8, CD90, ED1, PCNA, каспаз-3 с последующим компьютерным анализом срезов. Результаты исследования показали, что иммуносупрессивные изменения в селезенке, развивающиеся при хроническом стрессе, были связаны с типом примененного стрессора. При действии психологического стрессора отмечалось снижение объема белой пульпы, связанное, главным образом, с сокращением размеров Т-зон селезенки, снижением их клеточности и уменьшением удельной площади CD90⁺- и CD8⁺-клеток по сравнению с возрастным контролем, в то время как действие физического стрессора оказывало влияние как на Т-, так и на В-зоны селезенки, вызывая также уменьшение размеров лимфоидных узелков, ширины маргинальной зоны и удельной площади CD20⁺-клеток. Гипоплазия В-зон селезенки была связана, главным образом, с увеличением числа апоптотических изменений клеток, в то время как Т-зон — с уменьшением уровня пролиферации и снижением транспорта недавних тимусных иммигрантов в селезенку.

Ключевые слова: селезенка, клетки, иммуногистохимия, хронический стресс, крысы.

Стресс запускает в организме цепь интегрированных реакций нервной, эндокринной и иммунной систем, обусловленных активацией гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной (ГГАО) и симпатико-адреналовой осей, приводящей к сложным иммуномодуляторным изменениям, которые особенно легко провоцируются в раннем постнатальном онтогенезе из-за морфофункциональной незрелости лимфоидных органов, отсутствия устойчивых связей между ними, их компартментами и субкомпартментами, иммунocyтами и их микроокружением. При этом стресс-ассоциированная иммуномодуляция является многофакторным явлением, и разные стрессоры могут оказывать неодинаковое влияние на иммунный статус, что необходимо учитывать при прогнозировании диапазона, амплитуды и направленности постстрессовых иммунных сдвигов в растущем организме. Основным проявлением стресс-индуцированных изменений в иммунных органах, в частности, в селезенке, как наиболее компартментализованном среди них, является гипоплазия лимфоидной ткани, среди причин которой указывают на нарушение как притока, так и оттока иммунocyтов, избыточную гибель, заторможенную пролиферацию и

нарушение сигнальных взаимодействий [2, 3, 6–8]. При этом было неоднократно продемонстрировано, что с возрастом механизмы постстрессовой иммуномодуляции претерпевают определенную динамику, однако в раннем постнатальном онтогенезе она остается мало изученной [1, 5].

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка влияния различных по природе стрессоров на иммуноархитектонику селезенки неполовозрелых белых крыс.

Материал и методы. Неполовозрелых белых крыс-самцов линии Sprague-Dawley в возрасте 30 сут, содержащихся в стандартных виварных условиях при температуре 20±2 °С с доступом к воде и пище *ad libitum*, ежедневно на протяжении 7 сут подвергали либо действию водоиммерсионного стресса — по 5 ч в день (2-я экспериментальная группа), либо «стрессу ожидания» — вынужденному наблюдению за животными 2-й группы (1-я экспериментальная группа) [1]. Группу возрастного контроля (3-я группа), составляли крысы, которые находились в отдельном помещении вне контакта с экспериментальными животными. В каждую группу входили по 16 особей. По окончании эксперимента животных под анестезией декапитировали, у них брали и взвешивали лимфоидные органы (селезенка, тимус) и надпочечники. Макроскопически оценивали состояние слизистой оболочки желудка.

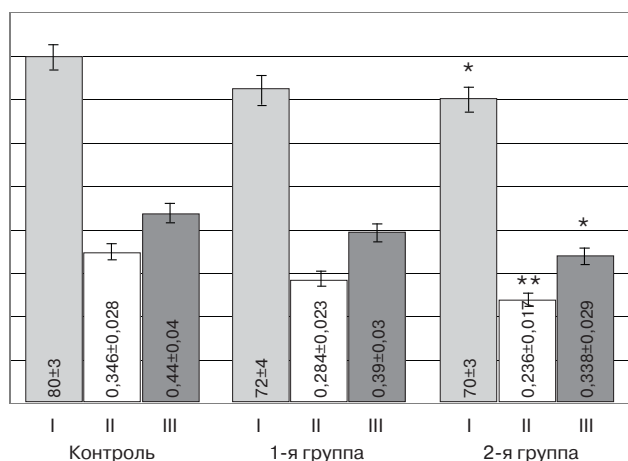


Рис. 1. Весовые параметры тела и селезенки у экспериментальных и контрольных животных.

I — масса тела (г); II — масса селезенки (г); III — относительная масса селезенки (%); различия по сравнению с контролем значимы: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

Селезенку фиксировали формалином, изготавливали парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином–эозином. На продольных срезах селезенки из каждого 2-го произвольно отобранного блока в каждой группе животных проводили иммуногистохимическую реакцию с использованием моноклональных антител к следующим антигенам: CD68 (клон ED1) — маркеру макрофагов (Serotec, США, MCA341R); CD8a (клон MRC OX8) — маркеру Т-супрессоров (Serotec, MCA48G); CD3 (клон 1F4) — маркеру зрелых Т-лимфоцитов (белковому комплексу, входящему в Т-клеточные рецепторы) (Serotec, MCA 772), CD90 — маркеру недавних тимусных иммигрантов (BD Pharmingen, США, клон HIS51, #550570), PCNA (клон PC10) — ядерному антигену пролиферирующих клеток (Serotec, MCA1558), каспазе-3 — маркеру апоптоза (Serotec). Реакции проводили с использованием авидин-биотинового комплекса с подавлением эндогенной пероксидазы, высвобождением эпитопов антигенов (кроме реакции на PCNA), обработкой блокирующей неиммунной сывороткой для предотвращения фонового окрашивания [11]. Количественную оценку удельной площади и численной плотности иммунореактивных клеток проводили с помощью программы Image-Pro+ 4.5 с последующим переносом полученных данных в программу Excel для вычисления средней арифметической, среднеквадратического отклонения, ошибки репрезентативности, определения необходимого числа наблюдений, коэффициента Стьюдента.

Результаты исследования. Исследование на макроскопическом уровне показало, что у животных обеих экспериментальных групп хроническое действие стрессора вызывало развитие акцидентальной инволюции тимуса, гипертрофии надпочечников и появление точечных кровоизлияний в слизистой оболочке желудка. Хроническое воздействие преимущественно физического стрессора приводило к снижению массы тела и селезенки экспериментальных животных ($P < 0,05$ и $P < 0,001$ соответственно), а также относительной

массы селезенки ($P < 0,05$), которое не достигало уровня значимости при действии психологического стрессора (рис. 1).

Микроскопическое исследование показало, что действие обоих видов стрессоров вызывает существенные структурные изменения в селезенке, свидетельствующие об иммуномодуляторных перестройках в организме экспериментальных животных, которые были сильнее выражены при хроническом действии физического стрессора. Это касалось таких признаков, как снижение объема белой пульпы с уменьшением размеров как лимфоидных узелков, так и периартериальных лимфоидных влаглищ (ПАЛВ), сужение маргинальной зоны вокруг обоих компартментов белой пульпы, уменьшение числа вторичных лимфоидных узелков, увеличение числа макрофагов с захваченными апоптозными тельцами не только в лимфоидных узелках, но и в ПАЛВ (рис. 2).

Иммуногистохимическое исследование в целом подтвердило данные наблюдения, дополнив их некоторыми деталями иммуномодуляторных изменений в компартментах селезенки (рис. 3–5), в частности, касающихся распределения CD8⁺-клеток и CD90⁺-клеток в Т-зонах селезенки и CD20⁺-клеток в лимфоидных узелках и маргинальной зоне. По данным количественного иммуногистохимического анализа, реакция Т- и В-клеточных популяций при действии разных видов стрессоров была неодинаковой. При действии психологического стрессора (1-я группа) удельная площадь CD20⁺-клеток изменялась незначительно, в то время как CD90⁺- и CD8⁺-клеток — значительно уменьшалась ($P < 0,05$); при этом действие физического стрессора вызывало значимое снижение удельной площади всех трех популяций лимфоидных клеток при его хроническом воздействии (рис. 6).

При реакции на CD4 у крыс иммунореактивными оказываются не только Т-лимфоциты-хелперы, но и клетки макрофагального ряда, чрезвычайно многочисленные в селезенке, что делает их количественную оценку малоинформативной. Удельная площадь CD68⁺-клеток в красной пульпе очень велика, однако в Т-зонах у контрольных животных эти клетки единичны, а в В-зонах (лимфоидных узелках) они практически отсутствуют, в то время как при хроническом стрессе их удельная площадь в обоих компартментах белой пульпы увеличивается. Компьютерный анализ изображения показал, что удельная площадь PCNA⁺-клеток значительно уменьшалась, а удельная площадь каспазы-3⁺-клеток значительно увеличивалась при хроническом стрессе с разным уровнем

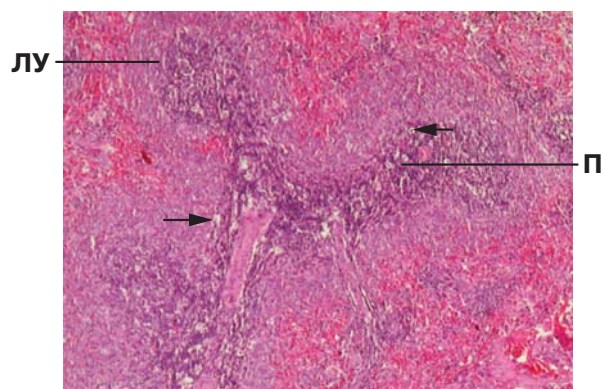


Рис. 2

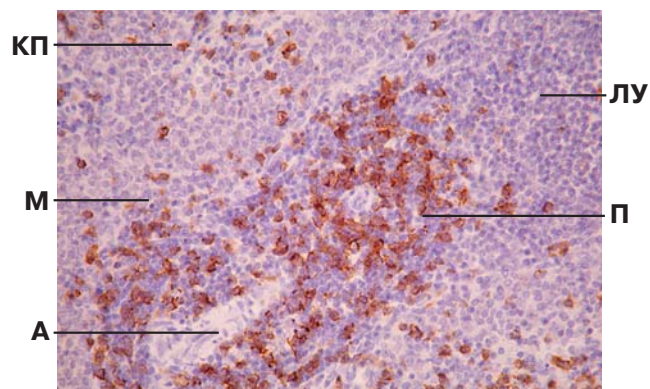


Рис. 3, а

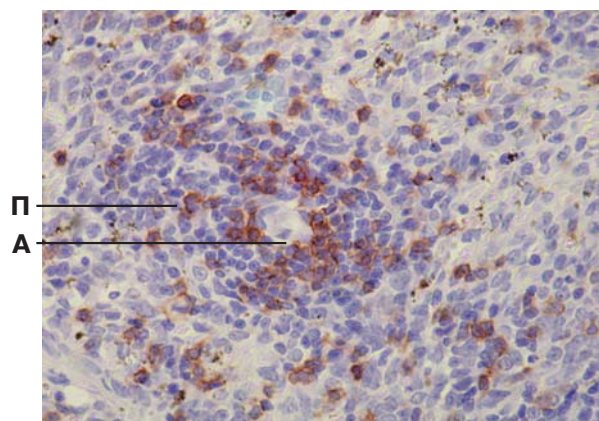


Рис. 3, б

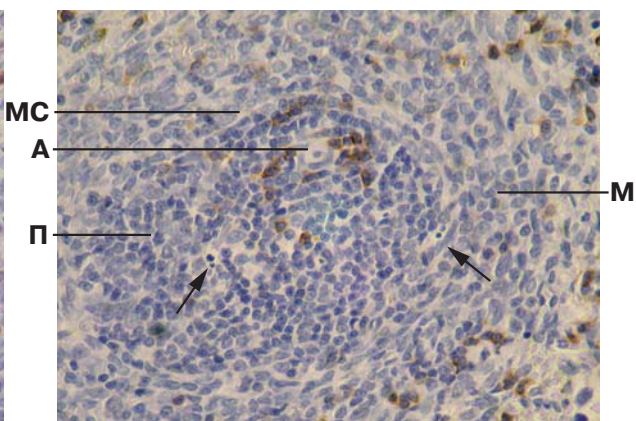


Рис. 3, в

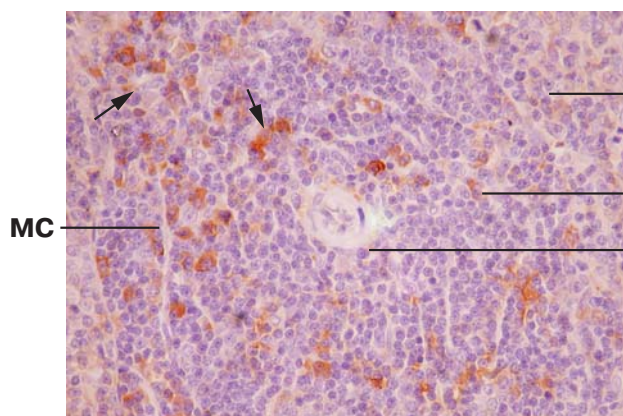


Рис. 4, а

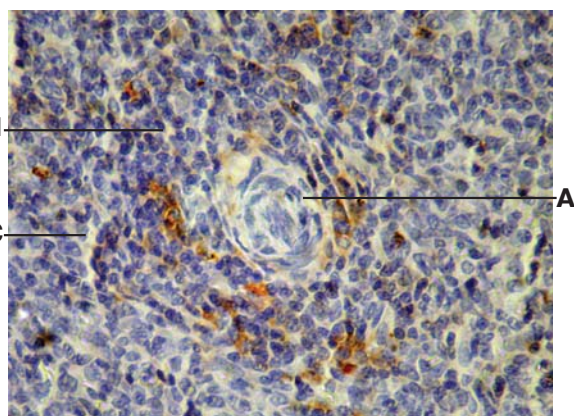


Рис. 4, б

Рис. 2. Селезенка 36-дневной крысы 2-й группы.

П — периартериальное лимфоидное влагалище; ЛУ — лимфоидный узелок; стрелки — макрофаги с неокрашенной цитоплазмой с захваченными апоптозными тельцами. Окраска гематоксилином — эозином. Ув. 40.

Рис. 3. Селезенка 36-дневных крыс 3-й группы (а), 1-й (б) и 2-й (в) группы.

А — артерия белой пульпы; М — маргинальная зона; КП — красная пульпа; МС — маргинальный синус. Остальные обозначения те же, что на рис. 2. Реакция на CD8, докраска гематоксилином. Ув. 200.

Рис. 4. Селезенка 36-дневных крыс 3-й (а) и 1-й (б) группы.

Обозначения те же, что на рис. 2 и 3. Реакция на CD90, докраска гематоксилином. Ув. 200.

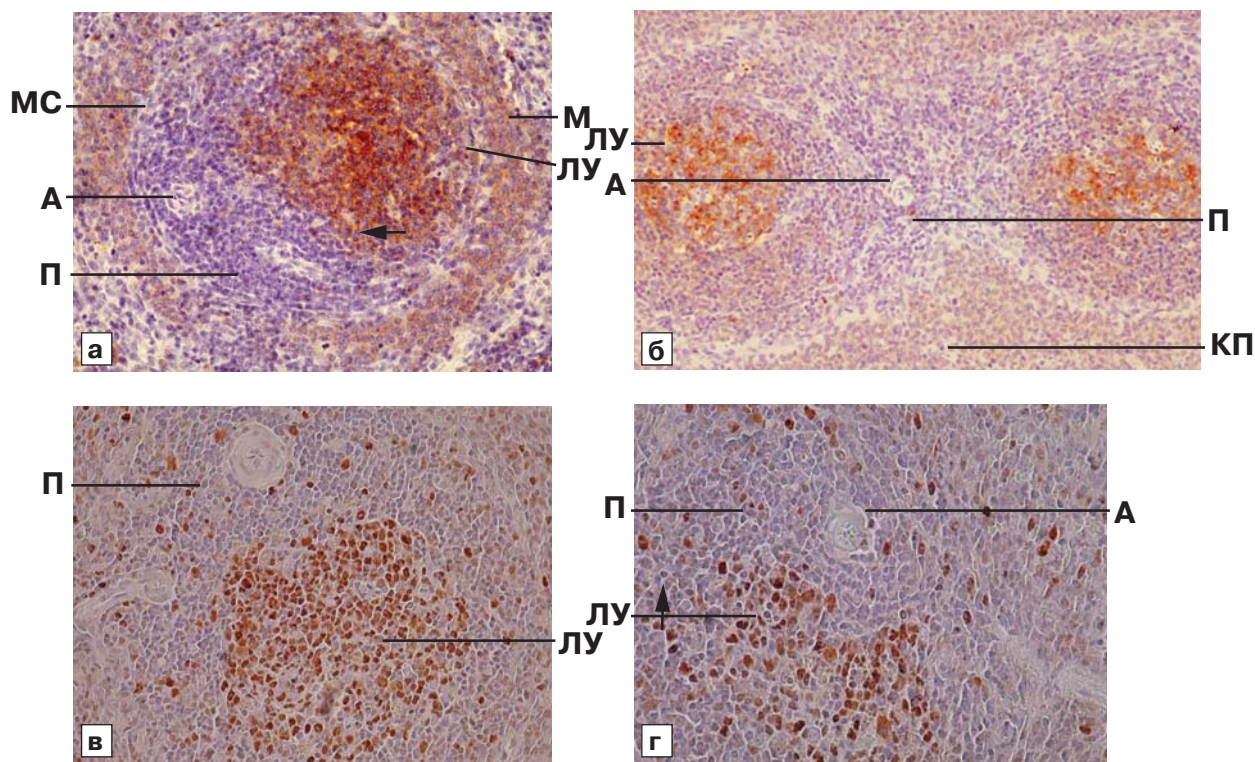


Рис. 5. Селезенка 36-дневных крыс 3-й (а, в) и 2-й (б, г) группы.

Обозначения те же, что на рис. 2 и 3. а, б — реакция на CD20; в, г — реакция на PCNA; докраска гематоксилином. Ув. 200.

значимости при действии психологического и физического стрессора (рис. 7).

Обсуждение полученных данных. В ряде исследований проведено сопоставление иммуномодуляционного эффекта физического и психологического стрессоров при хроническом их применении [8, 9]. При этом работ по возрастной морфологии периферических органов иммунной защиты в раннем постнатальном онтогенезе очень мало, и лишь единичные из них выполнены с применением морфологических методов исследования для оценки динамики популяций лимфоидных клеток в различных компартментах лимфоидных органов [10], хотя именно понимание структурной реорганизации лимфоидных органов при различных иммуномодулирующих воздействиях, особое место среди которых занимает стресс, имеет особое значение для оценки иммунного статуса и позволяет приблизить гипотезы и теоретические модели, используемые в *in vitro* экспериментах клеточной и молекулярной иммунологии к конкретному микроанатомическому контексту [4]. Высокий уровень компартментализации иммунных органов и, прежде всего, селезенки делает эту задачу применительно к периферическим лимфоидным органам особенно актуальной. В проведенном исследовании мы попытались обо-

значить спектр иммуномодуляционных изменений в селезенке растущего организма при действии стрессоров различных типов и определить их механизмы. Полученные нами данные о стресс-индуцированном снижении доли недавних тимусных иммигрантов в белой пульпе согласуются с данными других исследователей о том, что иммуносупрессивный эффект эндогенных кортикостероидов связан с ингибирующим действием на перемещение Т-клеток из тимуса на периферию [14]. При этом наши результаты не согласуются с данными других авторов, отмечающих усиление пролиферации лимфоцитов периферических иммунных органов при стрессе [12], что может быть связано с разницей в возрасте экспериментальных животных и примененных моделей стресса. Выявленные нами стресс-ассоциированные изменения уровня каспаза-3⁺-клеток в белой пульпе селезенки также не соответствуют данным других авторов, показавших, что спленоциты являются относительно устойчивыми к стрессу клетками в сравнении, например, с тимоцитами, так как у первых — меньше рецепторов глюкокортикоидов, высок уровень экспрессии bcl-2 и, в целом, они в меньшей степени доступны действию эндогенных кортикостероидов, чем лимфоциты других иммунных органов [7]. Объяснением этого противоречия может быть то обстоятельство, что

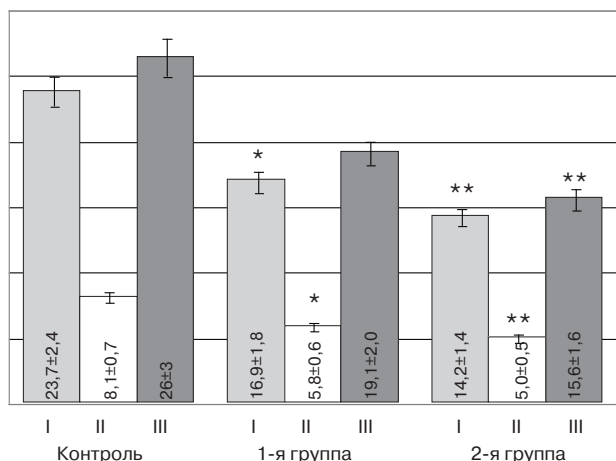


Рис. 6. Удельная площадь пролиферирующих и гибнущих путем апоптоза клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных.

Удельная площадь (%): I — CD8⁺-клеток; II — CD90⁺-клеток; III — CD20⁺-клеток; различия по сравнению с контролем значимы: * при $P<0,05$; ** при $P<0,01$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

в раннем постнатальном онтогенезе селезенка еще продолжает формировать свои компартменты и субкомпартменты, которые отличаются относительной незрелостью своих клеток, в то время как устойчивыми к индуцированному ГГАО апоптозу являются лишь зрелые спленоциты [13]. Кроме того, ГГАО-зависимый путь является не единственным иммуномодулирующим средством при стрессе. Спленоциты содержат также рецепторы опиоидов, стимулирование которых при стрессе также способно запускать избыточный апоптоз лимфоидных клеток [15].

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало, что хронический стресс, при действии как чисто психологического стрессора («стресс ожидания») так и преимущественно физического стрессора (водной иммерсии), вызывает изменения иммуноархитектоники селезенки растущего организма, соответствующие иммунодепрессивным состояниям [10, 13, 14,]. При этом, как показало количественное иммуногистохимическое исследование, эти изменения являются отражением примененной модели стресса. Так, психологический стресс в большей степени влиял на микроархитектонику Т-зон селезенки, в то время как физический стресс подавлял развитие как Т-, так и В-зон белой пульпы селезенки, вызывая их дегенерацию, что проявлялось утратой клеточных популяции Т-зон, таких как CD3⁺ и CD8⁺, и CD90⁺, а также CD20⁺. Полученные данные позволяют оценивать иммунный статус организма, подвергнувшегося действию хронического стрес-

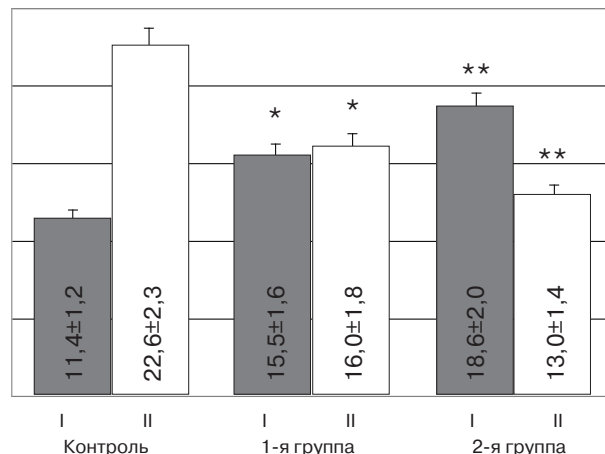


Рис. 7. Удельная площадь лимфоидных клеток селезенки у экспериментальных и контрольных животных.

Удельная площадь (%): I — каспаза-3⁺-клеток; II — PCNA⁺-клеток; различия по сравнению с контролем значимы: * при $P<0,05$; ** при $P<0,01$. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

са, и разрабатывать новые методы постстрессовой иммунокоррекции для детского организма.

Итак, у неполовозрелых крыс в возрасте, соответствующем инфантному периоду, хроническое действие чисто психологического стрессора вызывает иммуномодуляционные изменения в белой пульпе, затрагивающие, главным образом, ее Т-зоны, в то время как действие физического стрессора — изменение иммуноархитектоники как Т-, так и В-зон.

По данным иммуногистохимического анализа, основным механизмом гипоплазии В-зон белой пульпы селезенки является усиление апоптоза спленоцитов, а Т-зон — торможение их пролиферации и снижение притока недавних тимусных иммигрантов.

ЛИТЕРАТУРА

- Капитонова М.Ю., Кузнецов С.Л., Клаучек С.В. и др. Особенности акцидентальной инволюции тимуса в растущем организме при воздействии различных видов стрессоров. Морфология, 2007, т. 130, вып. 6, с. 56–61.
- Прасолова Л.А., Оськина И.Н. и Шихевич С.Г. Морфофункциональные характеристики селезенки у крыс разного поведения после воздействия рестрикционного стресса. Морфология, 2004, т. 125, вып. 1, с. 59–63.
- Сапин М.Р. и Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М., Джангар, 2000.
- Crivellato E., Vacca A. and Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. Trends Immunol., 2004, v. 25, № 4, p. 210–217.
- Dominguez-Gerpe L. and Rey-Mendez M. Modulation of stress-induced murine lymphoid tissue involution by age, sex and

- strain: role of bone marrow. *Mech. Ageing Dev.*, 1998, v. 104, № 2, с. 195–205.
6. Fu Y.X. and Chaplin D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, v. 17, p. 399–433.
 7. McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W. et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 1997, v. 23, p. 79–133.
 8. Oishi K., Nishio N., Konishi K. et al. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats. *Stress*, 2003, v. 6, № 1, p. 33–40.
 9. Palermo-Neto J., Massoco C.O. and de Souza W.R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity and Ehrlich tumor growth. *Brain, Behav. Immun.*, 2003, v. 17, p. 43–54.
 10. Pinchuk L.M. and Filipov N.M. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun. Ageing*, 2008, v. 5, p. 1–12.
 11. Polak J.M. and Van Noorden S. Introduction to immunohistochemistry, 3rd edition, Oxford, Bios Scientific Publishers, 2003.
 12. Satoh E., Edamatsu H. and Omata Y. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and proliferative response in splenic lymphocytes from mice. *Stress*, 2006, v. 9, № 4, p. 223–230.
 13. Shimizu T., Kawamura T., Miyaji C. et al. Resistance of extrathymic T cells to stress and the role of endogenous glucocorticoids in stress associated immunosuppression. *Scand. J. Immunol.*, 2000, v. 51, № 3, p. 285–292.
 14. Takai K., Takahara S., Itoyama N. et al. Effects of FTY720 on rat lymphoid organs. *Transplant. Proc.*, 2004, v. 36, № 8, p. 2453–2456.
 15. Yin D., Zhang Y., Stuart C. et al. Chronic restraint stress modulates expression of genes in murine spleen. *J. Neuroimmunol.*, 2006, v. 177, № 1–2, p. 11–17.

Поступила в редакцию 02.04.09

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE SPLEEN UNDER THE EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF STRESSORS

M.Yu. Kapitonova, S.L. Kuznetsov, S.B.S.A. Fuad, Yu.V. Degtyar, V.V. Khlebnikov, A.A. Nesterova and D.A. Chernov

The effect of different types of stressors (physical and psychoemotional) on the splenic immunoarchitecture in prepubertal Sprague-Dawley rats was evaluated using the quantitative immunohistochemical methods. Rats aged 1 month were exposed to chronic stress for 5 hours daily during 7 consecutive days. After the last stress session, animals were sacrificed, spleen was obtained for weighing and processed for routine histology and immunohistochemistry (CD3, CD8, CD90, CD20, ED1, PCNA, caspase-3) with subsequent computer image analysis. The results obtained demonstrated that the range of stress-induced immunosuppressive changes in the splenic compartments was associated with the type of stressor. Chronic exposure to purely psychological stress resulted in the decreased volume of the splenic white pulp associated mainly with the reduction of T-cell subcompartments with the decrease in their cellularity and the reduction of volume density of CD90⁺ and CD8⁺ cells in them compared to those in age-matched control animals, while the physical stressor affected both T- and B-subcompartments of the white pulp causing the reduction of lymphoid nodule volume, marginal zone width and volume density of CD20⁺ cells. Hypoplasia of the splenic B-zones was mainly associated with increased splenocyte apoptotic rate while that of the T-zones – with decreased proliferation rate and attenuated traffic of the recent thymic immigrants into the spleen.

Key words: *spleen, cells, immunohistochemistry, chronic stress, rats.*

Faculty of Medicine, International Technological University UiTM (MARA), Shah Alam, Malaysia; Department of Histology, Embryology and Cytology, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy; Department of Histology, Embryology and Cytology and Department of Forensic Medicine, Volgograd State Medical University