

abnormal granules in beige rats. J. Comp. Pathol., 1994, v. 110, № 4, p. 369–379.

Поступила в редакцию 04.04.2011

MORPHOLOGY AND CYTOCHEMISTRY OF ABNORMAL CYTOPLASMIC GRANULES IN BLOOD LEUKOCYTES IN SAPPHIRE MINKS (CYTOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL STUDY)

L.B. Uzenbayeva, A.G. Kizhina, V.A. Iliukha and N.N. Tiutiunnik

Detailed morphological and cytochemical investigation of blood leukocytes was performed in minks of three genotypes: dark-brown minks (n=10), which had the color resembling

that of the wild type, mutant silver-blue (p/p) minks (n=10), and sapphire minks (a/a p/p) (n=10). The sapphire minks were demonstrate to have a hereditary defect of leukocyte granules containing peroxidase, nonspecific esterases and non-enzymatic cationic protein. These granules have abnormally large size, the neutrophil cytoplasm contains one to several abnormal granules, they are numerous in eosinophil and basophil cytoplasm and rare in lymphocytes and monocytes. Morphological and cytochemical features indicate the similarity of hereditary leukocytes pathology of sapphire mink with that one found in human Chediak-Higashi syndrome.

Key words: leukocytes, cytochemistry, enzymes, mink, Chediak–Higashi syndrome

Institute of Biology, RAS Karelian Scientific Center, Petrozavodsk State University

© Е.А. Иванова, 2011
УДК 611.428:616.8-008.615:599.323.4

Е.А. Иванова

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ГЕРМИНАТИВНЫХ ЦЕНТРОВ АГРЕГИРОВАННЫХ ЛИМФОИДНЫХ УЗЕЛКОВ ТОНКОЙ КИШКИ И БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПОСЛЕ ОСТРОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Кафедра анатомии человека (зав. — академик РАМН проф. М.Р. Сапин), Первый Московский медицинский университет им. И.М. Сеченова, e-mail: elena.al.ivanova@gmail.com

В физиологическом состоянии у взрослых крыс-самцов линии Вистар площади герминативных центров (ГЦ) лимфоидных узелков тонкой кишки были больше, чем аналогичные структуры в брыжеечных лимфатических узлах. При этом данные различия в группе стрессоустойчивых крыс более выражены по сравнению со стресс-предрасположенными особями. Воздействие острого эмоционального стресса (иммобилизация в плексигласовых боксах в течение 1 ч с раздражением области спины электрическим током) приводила к уменьшению размеров площадей ГЦ. Восстановление изученных морфометрических показателей в группе стрессоустойчивых крыс завершилось в более ранние сроки (к 3-м суткам после стрессорного воздействия), а у предрасположенных животных — к 7-м суткам. К 14-м суткам после острого эмоционального стресса в группе устойчивых крыс размеры площадей ГЦ соответствовали контрольным показателям, а у предрасположенных животных — были ниже исходных, что указывает на истощение функциональных возможностей лимфоидной ткани у данной группы животных.

Ключевые слова: агрегированные лимфоидные узелки, брыжеечные лимфатические узлы, герминативные центры, острый эмоциональный стресс, крысы Вистар

В развитии адаптивных реакций при стрессорных воздействиях ключевую роль играют интегративные системы: нервная, эндокринная и иммунная [4, 5, 12, 13]. Наиболее крупным периферическим отделом иммунной системы является кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань (КАЛТ) [3, 6, 11]. Иммунные структуры, ассоциированные со слизистой оболочкой тон-

кой кишки, расцениваются как первый барьер, готовый оказать иммунную защиту в случае антигенного воздействия на слизистую оболочку. Вторым таким барьером являются регионарные брыжеечные лимфатические узлы [11]. К особенностям иммунных структур тонкой кишки относят наличие агрегированных лимфоидных узелков (АЛУ) [2]. Известно, что при активации

иммунных структур происходит резкое увеличение числа лимфоидных узелков (ЛУ), имеющих герминативные центры (ГЦ) [2, 10, 11]. Их появление отражает процесс пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов в ЛУ. Считается, что в ГЦ осуществляется пролиферация лимфоцитов или так называемая «клональная селекция», приводящая к появлению клеток, синтезирующих иммуноглобулины с наиболее подходящей структурой антигенсвязывающего участка [3, 6, 8].

Выраженность и направленность адаптивных реакций индивидуума определяется не только видом и силой стрессорного воздействия, но и гено- и фенотипическими особенностями организма [4, 5, 7, 11, 12]. В настоящее время наиболее распространенным способом выявления индивидуальной устойчивости экспериментальных животных к проявлению негативных последствий стрессорного воздействия является тест «открытое поле». Установлена корреляция между поведенческой активностью животных в «открытом поле» и их устойчивостью к стрессорному воздействию [7, 12].

В современной литературе большое внимание уделяется состоянию иммунных структур при стрессорных воздействиях [4, 5, 15, 16], однако проблеме индивидуальной вариабельности этих структур посвящены единичные работы [11, 12]. В частности, отсутствуют данные по сравнительной характеристике АЛУ тонкой кишки и ЛУ брыжеечных лимфатических узлов у животных с разной стрессоустойчивостью. Особенности восстановления данных структур после воздействия острого эмоционального стресса у животных с различной поведенческой активностью также до сих пор остаются неизвестными.

Цель данного исследования — изучить характеристики АЛУ тонкой кишки и ЛУ брыжеечных лимфатических узлов у животных с учетом их поведенческой активности и процессов восстановления данных лимфоидных структур после психоэмоционального воздействия.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 105 крысах-самцах Вистар массой 220 ± 5 г, в осенне-зимний период. В постановке эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными на заседании этической комиссии ГУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН (протокол № 1 от 3 сентября 2005 г.), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Индивидуально-типологические характеристики крыс определяли при их тестировании в «открытом поле» [7, 12]. На основании полученных результатов, выделены две группы крыс: поведенчески активные ($n=54$) — индекс активности 4,5–6 и пассивные ($n=51$) — предрасположенные к эмоциональному стрессу животные (индекс активности

0,2–0,6). Для решения поставленных задач экспериментальных животных разделили на группы: поведенчески активные и пассивные крысы — контрольные группы (АК, $n=8$ и ПК, $n=8$); группы крыс после 1-часового стрессорного воздействия (АСо, $n=10$ и ПСо, $n=9$); группы крыс через 1 сут после стрессорного воздействия (АС1, $n=9$ и ПС1, $n=7$); группы крыс через 3 сут после стрессорного воздействия (АС3, $n=7$ и ПС3, $n=7$); группы крыс через 7 сут после стрессорного воздействия (АС7, $n=10$ и ПС7, $n=10$); группы крыс через 14 сут после стрессорного воздействия (АС14, $n=10$ и ПС14, $n=10$).

Для достижения отрицательного эмоционального воздействия использовали иммобилизационный стресс в плексигласовых боксах с одновременным электрокожным раздражением области спины животного в течение 1 ч [7]. Силу раздражения подбирали индивидуально по порогу вокализации в ответ на электрическую стимуляцию. Крысам в течение 1 ч наносили раздражение в области спины электрическими импульсами напряжением 4–6 В, частотой 50 Гц.

Животных выводили из эксперимента методом декапитации. Забой животных контрольной группы и крыс, подвергшихся стрессорному воздействию, осуществляли сразу после его окончания, экспериментальных животных выводили из опыта также через 1, 3, 7, 14 сут после стрессорного воздействия. До этого периода контрольные и стрессированные устойчивые и предрасположенные особи находились в клетках вивария. После декапитации у каждой особи забирали срединный брыжеечный лимфатический узел (из группы lymphonodi jejunes) и подвздошную кишку (≈ 1 см) с АЛУ на 1 см выше от подвздошно-слепкишечного перехода. Изготавливали гистологические препараты по общепринятой методике с окраской гистологических структур азуром-П-эозином и гематоксилином-эозином.

Морфометрическим методом Г.Г. Автандилова [1] изучали площади, занимаемые ГЦ ЛУ брыжеечных лимфатических узлов и АЛУ тонкой кишки. Измерения производили на фотографиях гистологических препаратов, полученных на микроскопе AxioPlan 2 (Карл Цейс, Германия) при помощи морфометрической программы AxioVision (Карл Цейс, Германия). Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Значимость различий между группами выявляли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. У крыс, в отличие от человека, АЛУ выявлены не только в подвздошной, но и в тощей кишке, а одиночные ЛУ встречались сравнительно редко.

В контрольных группах стрессоустойчивых и стресс-предрасположенных животных подавляющее большинство ЛУ в АЛУ имели ГЦ, тогда как в брыжеечных лимфатических узлах количество ЛУ с ГЦ и без них было примерно одинаковым. Кроме того, выявлено, что у контрольной группы стрессоустойчивых крыс площади, занимаемые ГЦ в АЛУ тонкой кишки, были больше на 22%, чем аналогичные показатели в брыжеечных лимфатических узлах (таблица). При этом у контрольной группы стресс-предрасположенных животных площади ГЦ ЛУ брыжеечных лимфатических узлов были на 48% больше, чем аналогичный показатель

Площади, занимаемые на срезах тонкой кишки и брыжеечных лимфатических узлов герминативными центрами лимфоидных узелков у экспериментальных животных после воздействия острого эмоционального стресса
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм²; min-max)

Группы животных	Устойчивость к стрессу	Сроки выведения из эксперимента после стрессорного воздействия (сут)	Агрегированные лимфоидные узелки тонкой кишки	Брыжеечные лимфатические узлы
Контрольная	Устойчивые	0	1,61±0,26 [#] (0,85–2,26)	1,25±0,14 [#] (0,65–1,95)
	Предрасположенные	0	2,6±0,4 (1,45–2,95)	2,4±0,8 (0,65–3,52)
Экспериментальная (стресс)	Устойчивые	0	1,5±0,3 (0,96–1,98)	1,07±0,08* (0,65–2,35)
	Предрасположенные	0	1,8±0,4* (0,65–2,34)	1,92±0,26* (0,44–2,35)
	Устойчивые	1	1,42±0,28* (0,96–2,26)	1,12±0,09 [#] (0,72–1,68)
	Предрасположенные	1	1,5±0,3* [#] (0,65–2,23)	1,7±0,3* (0,76–2,45)
	Устойчивые	3	2,4±0,7* [#] (0,75–3,22)	1,32±0,22 (0,74–2,36)
	Предрасположенные	3	1,4±0,3* (0,44–1,83)	1,22±0,14 (0,55–1,85)
	Устойчивые	7	2,0±0,9 [#] (0,98–3,25)	1,72±0,24* (1,02–2,75)
	Предрасположенные	7	1,9±0,4* (0,68–2,35)	1,82±0,35* (0,65–2,05)
	Устойчивые	14	1,38±0,14* (0,54–2,48)	1,4±0,5 (0,60–2,00)
	Предрасположенные	14	1,32±0,27* (0,55–1,96)	1,6±0,3* (0,66–2,23)

* Различия значимы при $P < 0,05$ по сравнению с животными контрольной группы.

[#] Различия значимы при $P < 0,05$ по сравнению со стресс-предрасположенными животными.

у контрольных стрессоустойчивых крыс (см. таблицу).

Сразу после окончания 1-часового воздействия у стрессоустойчивых животных площади ГЦ в АЛУ тонкой кишки были больше, чем аналогичные показатели в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов. У стресс-предрасположенных особей, по отношению к контрольным животным своей группы, выявили снижение площадей, занимаемых на срезе ГЦ в АЛУ тонкой кишки и в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов в 1,41 и 1,26 раза соответственно. В группе стрессоустойчивых крыс данные показатели практически не изменились ($P > 0,05$). Кроме того, у стресс-предрасположенных особей после окончания 1-часового стрессового воздействия площади ГЦ в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов были больше на 44%, чем аналогичные показатели у стрессоустойчивых крыс (см. таблицу).

Через 1 сут после окончания воздействия острого эмоционального стресса в мозговом веществе брыжеечных лимфатических узлов выявили лимфоидные скопления округлой формы, кото-

рые трактовали как образование «предузелков» (рисунок).

Через 1 сут после окончания воздействия у стрессоустойчивых животных площади ГЦ в АЛУ тонкой кишки были больше, чем аналогичные структуры у брыжеечных лимфатических узлов — в 1,27 раза, или на 21% ($P < 0,05$). В группе стресс-предрасположенных животных разница в размерах площадей, занимаемых ЛУ в тонкой кишке и в брыжеечных лимфатических узлах, была статистически незначима ($P > 0,05$). У стресс-предрасположенных особей через 1 сут после окончания стрессорного воздействия по отношению к контрольным животным своей группы выявили снижение площадей, занимаемых на срезе ГЦ в АЛУ тонкой кишки и в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов в 1,68 и 1,4 раза соответственно. В группе стрессоустойчивых крыс в аналогичные сроки эксперимента изменения площадей данных структур по отношению к контролю своей группы были статистически незначимы ($P > 0,05$). У стресс-предрасположенных крыс через 1 сут после окончания острого эмоцио-

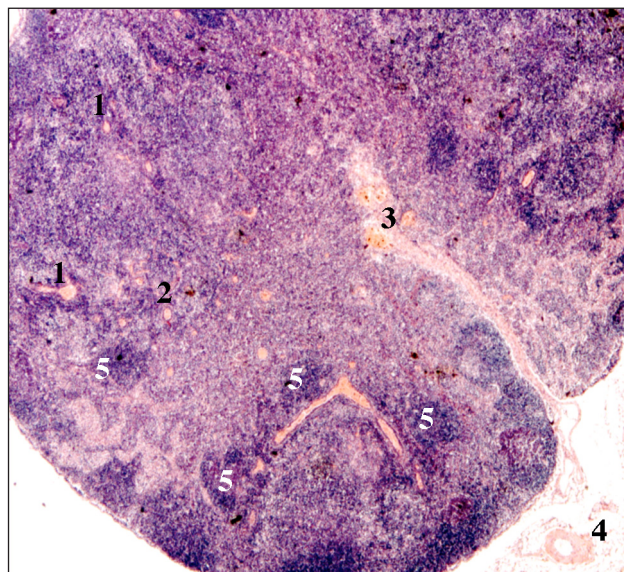
нального стресса площади, занимаемые ГЦ в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов, были больше на 35%, чем аналогичные показатели у стрессоустойчивых особей (см. таблицу).

Через 3 сут после воздействия у стрессоустойчивых животных площади ГЦ АЛУ тонкой кишки были больше в 1,79 раза, или на 44%, чем соответствующие площади в брыжеечных лимфатических узлах. У стресс-предрасположенных особей в эти сроки по отношению к контрольным животным своей группы выявили снижение площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки и в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов — в 1,83 и 1,98 раза соответственно. В группе стрессоустойчивых крыс в аналогичные сроки эксперимента, напротив, установлено возрастание площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки — в 1,47 раза по сравнению с контрольными особями своей группы. У стрессоустойчивых крыс через 3 сут после окончания острого эмоционального стресса площади ГЦ в АЛУ тонкой кишки были больше на 40%, чем соответствующий показатель у стресс-предрасположенных крыс в аналогичных условиях (см. таблицу).

Через 7 сут после воздействия у стрессоустойчивых крыс выявили увеличение площадей, занимаемых на срезе ГЦ в АЛУ тонкой кишки и в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов — в 1,25 и 1,38 раза соответственно по отношению к показателям у контрольных животных своей группы. В группе стресс-предрасположенных особей в аналогичные сроки эксперимента установлено снижение площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки и в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов — в 1,38 и 1,32 раза соответственно по сравнению с данными контроля своей группы. Различия в размерах площадей, занимаемых ГЦ в исследуемых лимфоидных образованиях в данные сроки эксперимента у стрессоустойчивых и стресс-предрасположенных крыс, не выявлены ($P > 0,05$) (см. таблицу).

Через 14 сут после стрессорного воздействия различия у стрессоустойчивых и стресс-предрасположенных крыс в размерах площадей, занимаемых ГЦ в исследуемых лимфоидных структурах, не выявлены ($P > 0,05$). Однако у стресс-предрасположенных крыс выявили уменьшение площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки и в ЛУ брыжеечных лимфатических узлов — в 1,97 и 1,54 раза соответственно по отношению к показателям у контрольных животных своей группы (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Известно, что в активации В-лимфоцитов в брыжеечной части тонкой кишки принимают участие особые структуры. Так, в куполе АЛУ располагаются М-клетки, содержащие в «кармане-инвагинации» на базальной части макрофаги и



Участок брыжеечного лимфатического узла стресс-предрасположенного животного через 1 сут после стрессорного воздействия.

Многочисленные расширенные и наполненные кровью сосуды в паракортикальной зоне (1), мозговом веществе (2), воротном синусе (3) и капсуле узла (4), 5 — «предузелки» в мозговом веществе. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 50.

Т-хелперы [11, 14, 15]. Кроме того, в самих ГЦ ЛУ имеются специализированные антиген-презентирующие фолликулярные дендритные клетки, характерные для В-зависимых зон лимфоидных образований [2, 10].

Можно предположить, что в физиологических условиях АЛУ тонкой кишки по сравнению с брыжеечными лимфатическими узлами испытывают большую функциональную нагрузку, что очевидно связано с барьерной функцией слизистой оболочки тонкой кишки. В АЛУ тонкой кишки выявили большие размеры ГЦ по сравнению с аналогичными структурами в брыжеечных лимфатических узлах. Кроме того, подавляющее число АЛУ тонкой кишки имели ГЦ. Наибольшие различия морфометрических показателей в ГЦ ЛУ выявили в контрольной группе у стрессоустойчивых крыс. Это согласуется с указанием Д.А. Жданова и М.Р. Сапина [11] о том, что вариабельность иммунологических показателей обеспечивает их наибольшую функциональную надежность.

1-часовая стрессорная нагрузка приводила к уменьшению размеров площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки и ЛУ брыжеечных лимфатических узлов крыс, предрасположенных к стрессу. Возможно, этот феномен объясняется, с одной стороны, миграцией клеток из ГЦ, а с другой — угнетением митотической активности клеток лимфоидного ряда под воздействием «гормональных осей стресса» [4, 5, 8, 14–16]. Данные изменения

были наиболее значимыми в ГЦ в АЛУ тонкой кишки по сравнению с подобными структурами брыжеечных лимфатических узлов.

В группе стрессоустойчивых крыс на 3-и сутки после прекращения воздействия выявлено увеличение площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки, которое даже превышало контрольные показатели. В группе стресс-предрасположенных животных, подвергшихся воздействию, возрастание площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки отмечалось к 7-м суткам и не достигало исходных цифр. У стрессоустойчивых и стресс-предрасположенных крыс площади ГЦ ЛУ брыжеечных лимфатических узлов восстанавливались на 7-е сутки после прекращения стрессорного воздействия, причем у стрессоустойчивых животных данный показатель превышал контрольные значения ($P < 0,05$), а у стресс-предрасположенных — не достигал их ($P < 0,05$).

К 14-м суткам после прекращения воздействия у группы стрессоустойчивых крыс размеры площадей ГЦ в АЛУ тонкой кишки соответствовали контрольным цифрам, а аналогичные показатели в брыжеечных лимфатических узлах превышали исходные данные ($P < 0,05$), что указывает на высокие адаптационные способности особей этой группы. У стресс-предрасположенных крыс к 14-м суткам после окончания воздействия острого эмоционального стресса (отдаленные сроки эксперимента) выявили снижение размеров площадей ГЦ ЛУ брыжеечных лимфатических узлов и особенно АЛУ тонкой кишки, что возможно указывает на истощение функциональных возможностей лимфоидной ткани у этой группы животных.

Таким образом, стресс-предрасположенные животные характеризуются исходно большей функциональной активностью лимфоидных структур и соответственно более быстрым истощением функциональных возможностей лимфоидной ткани.

Выявленные сроки восстановления клеток лимфоидного ряда у крыс согласуются с данными ряда исследователей о временных параметрах развития этапов иммунного ответа и «сроками риска» (сроками выявления наибольшей частоты осложнений), наблюдаемых в клинической практике [2, 5, 8, 11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Аминова Г.Г. Структура лимфоидных узелков и их систематизация. В кн.: Научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии»: Сборник научных трудов. М., МДВ, 2010, с. 6–9.
3. Белоцкий С.М. и Авталион Р.Р. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. М., БИНОМ, 2008.
4. Бузунов А.Ф. Формирование соматических последствий адаптационного синдрома. Цена цивилизации. М., Практическая медицина, 2010.
5. Виноградов В.В. Стресс и патология. Минск, Белорус. наука, 2007.
6. Горячкина Л.А. и Кашкин К.А. Клиническая аллергология и иммунология: руководство для практикующих врачей. М., Миклош, 2009.
7. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу. Вестн. новых мед. технологий, 2002, т. 1Х, № 1, с. 16–18.
8. Лебедев К.А. и Понякина И.Д. Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология). М., Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009.
9. Никулин Б.А. Оценка и коррекция иммунного статуса. М., ГЭОТАР-Медиа, 2007.
10. Райт Д. Морфологическая диагностика патологии лимфатических узлов. М., Мед. лит., 2008.
11. Сапин М.Р. и Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М., АПП «Джангар», 2004.
12. Судаков К.В. и Умрюхин П.Е. Системные основы эмоционального стресса. М., ГЭОТАР-Медиа, 2010.
13. Dhabhar F.S. Stress — induced augmentation of immune function — the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. Brain Behav. Immun., 2002, v. 16, № 6, p. 785–798.
14. Dommett R., Zilbauer M., George J.T. and Bajaj-Elliott M. Innate immune defense in the human gastrointestinal tract. Molec. immunol., 2005, v. 42, № 8, p. 903–912.
15. Necela B.M. and Cidlowski J.A. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in non inflammatory and inflammatory cells. Proc. Amer. Thorac. Soc., 2004, v. 1, p. 239–246.
16. Stellato C. Post-transcriptional and non genomic effects of glucocorticoids. Proc. Amer. Thorac. Soc., 2004, v. 1, p. 255–263.

Поступила в редакцию 02.03.2011

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF MORPHOMETRIC PARAMETERS OF GERMINAL CENTERS IN THE AGGREGATED LYMPHOID NODULES OF THE SMALL INTESTINE AND MESENTERIC LYMPH NODES FOLLOWING ACUTE EMOTIONAL STRESS

Ye.A. Ivanova

Under physiological conditions, the germinal center (GC) area of aggregated lymphoid nodules of the small intestine in adult male Wistar rats was greater than that of the similar structures in the mesenteric lymph nodes. Moreover, these differences were more pronounced in a group of stress-resistant rats as compared to stress-prone animals. The exposure to acute emotional stress (immobilization in plexiglas boxes for 1 hour with the irritation of the back area with the electric current) reduced GC size. Restoration of the morphometric parameters studied in the group of stress-resistant rats was completed at an earlier date (by Day 3 after exposure to stress), while in susceptible animals it took place by Day 7. By Day 14 after an acute emotional stress, GC size in a group of stress-resistant rats were similar to those in control group, while in susceptible animals they were lower than the baseline values, indicating that the depletion of the functional capacities of lymphoid tissue in this group of animals.

Key words: aggregated lymphoid nodules, mesenteric lymph nodes, germinal centers, acute emotional stress, Wistar rats

Department of Human Anatomy, The First I. M. Sechenov Moscow Medical University