

© Коллектив авторов, 2006  
УДК 611.438:616.8-008.615:599.323.4

*М.Ю. Капитонова<sup>1, #</sup>, С.Л. Кузнецов<sup>2</sup>, С.В. Клаучек<sup>3</sup>, З.И. Мохд Исмаил<sup>4</sup>, М. Улла<sup>4</sup> и О.В. Федорова<sup>1</sup>*

## АКЦИДЕНТАЛЬНАЯ ИНВОЛЮЦИЯ ТИМУСА В РАСТУЩЕМ ОРГАНИЗМЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССОРОВ\*

<sup>1</sup> Кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — проф. М.Ю.Капитонова) и <sup>3</sup> физиологии (зав. — проф. С.В.Клаучек) Волгоградского государственного медицинского университета; <sup>2</sup> кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — чл.-кор. РАМН С.Л.Кузнецов) Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова;

<sup>4</sup> кафедра анатомии (зав. — канд. мед. наук З.И.Мохд Исмаил) Университета Сайнс Малейша, Кота Бару, Малайзия

С применением количественной иммуногистохимии произведена оценка иммуномодулирующего действия различных видов стрессоров (физических и психоэмоциональных) на тимус растущих экспериментальных животных. Крысы Sprague Dawley в возрасте 21 сут подвергали действию водоиммерсионного стресса или «стресса ожидания» на протяжении 7 сут ежедневно по 5 ч. По окончании последнего сеанса стресса тимус извлекали, взвешивали и обрабатывали общегистологическими и иммуногистохимическими методами (выявление CD3, CD8, ED1, PCNA) с последующим автоматическим анализом изображения. Исследование показало наличие резкой акцидентальной инволюции тимуса в обеих группах экспериментальных животных, которая была более выраженной при действии физического стрессора, чем «чисто» психоэмоционального. Ведущими факторами постстрессовой гипоплазии тимуса явились избыточный апоптоз кортикальных тимоцитов и торможение их пролиферации, но не усиление их транспорта в периферические иммунные органы.

**Ключевые слова:** тимус, акцидентальная инволюция, иммуногистохимия, физический стресс, психоэмоциональный стресс.

Современные представления об иммуномодулирующем действии стресса, связанного с повышенным риском развития инфекций, новообразований и аутоиммунных состояний, а также о его механизмах характеризуются значительной неоднородностью и противоречивостью [1, 4, 5, 10]. По данным литературы, диапазон стрессиндуцированных иммуномодуляционных изменений очень широк: от отсутствия таковых [15, 16] до отчетливо выраженного иммуносупрессивного действия хронического стресса на организм человека и экспериментальных животных [8, 11] или потенцирования им иммунного ответа [6].

Способность организма отвечать на стресс изменением своих иммунных функций зависит от возраста, пола, условий жизни, а также вида стресса и продолжительности его воздействия. Влияние различных стрессоров на структуру иммунных органов на ранних этапах онтогенеза мало изучено, хотя хорошо известно, что именно в этот период иммунная система наиболее чувствительна к действию большинства патогенов [3, 7, 12]. Изучение диапазона и механизмов иммуномодуляционных сдвигов в организме в различные возрастные периоды представляет интерес и с практической точки зрения, в частности, разработки лечебных тактик, предотвращающих развитие постстрессовой патологии [9, 11].

Цель настоящего исследования — изучить особенности акцидентальной инволюции тимуса развивающегося организма при действии физического и психоэмоционального стрессоров.

**Материал и методы.** Исследование проведено на 48 крысах Sprague Dawley в возрасте 21 сут, которые были разделены на 3 группы — по 16 особей в каждой — контрольную (1-я группа) и 2 экспериментальные (2-я и 3-я группа). Всех крыс содержали в стандартных виварных условиях при температуре 20±2 °С с доступом к воде и пище ad libitum. Животных 2-й группы ежедневно на протяжении 7 сут по 5 ч в день подвергали действию водно-иммерсионного стресса — экспозиция в воде с температурой 20 °С и достигающей мечевидного отростка в положении на задних конечностях [17, с некоторыми модификациями], в то время как животные 3-й группы в это же время испытывали психоэмоциональный стресс, вынужденные наблюдать за животными 2-й группы, так как между животными 2-й и 3-й группы были возможны визуальные и слуховые контакты [13, с некоторыми модификациями]. По окончании опыта животных экспериментальных групп и группы возрастного контроля, содержащихся в отдельном помещении вне контакта с экспериментальными животными, умерщвляли, у них извлекали и взвешивали тимус и надпочечники.

Парафиновые срезы тимуса, фиксированного формалином, окрашивали гематоксилином—эозином. Срезы со 2-го произвольно отобранного блока каждой группы животных дополнительно окрашивали иммуногистохимически моноклональными антителами к следующим антигенам: CD68 (клон ED1) — маркер макрофагов (Serotec, Великобритания, MCA341R); CD8a (клон MRC OX8) — маркер двойных

# e-mail: marina@kb.usm.my

\* Исследование выполнено при поддержке гранта Universiti Sains Malaysia 304/PPSP/6131238.

позитивных тимоцитов и зрелых Т-супрессоров (Serotec, MCA48G); CD3 (клон 1F4) — маркер зрелых тимоцитов (белкового комплекса, входящего в Т-клеточные рецепторы) (Serotec, MCA 772) PCNA (клон PC10) — ядерного антигена пролиферирующих клеток (Serotec, MCA1558). Окрашивание проводили авидин-биотин-пероксидазным методом с подавлением эндогенной пероксидазы, обработкой блокирующей неиммунной сывороткой для предотвращения фонового окрашивания, высвобождением эпитопов антигенов (кроме окрашивания на PCNA) [14].

Применен цифровой автоматический анализ изображения для оценки размеров, удельной площади и численной плотности иммунореактивных клеток с помощью программы Image-Pro+ с применением оригинального алгоритма сопряжения данной программы с программой Excel для вариационно-статистической обработки данных (вычисление средней арифметической, среднеквадратического отклонения, ошибки репрезентативности, определения необходимого числа исследований; оценка значимости различий по критерию Стьюдента, а также, при необходимости, критерия Колмогорова–Смирнова).

**Результаты исследования.** Исследование показало, что хронический стресс очень сильно влияет на рост неполовозрелых животных и динамику массы тела и тимуса (рис. 1). Отмечено замедление темпов роста тела животных в обеих экспериментальных группах: в контрольной группе прибавка массы тела за 1 нед эксперимента составила в среднем 51%, а во 2-й и 3-й группе — 35% и 25% соответственно, между экспериментальными группами различие массы тела было также значимым ( $P < 0,01$ ). Различие массы тимуса между двумя экспериментальными группами было также значимым ( $P < 0,01$ ), в противоположность этому различие относительной массы органа, значение которой в условиях колебания массы тела позволяет выявить наличие истинной гипотрофии органов, между экспериментальными группами не достигало уровня значимости. В обеих экспериментальных группах имела место гипертрофия надпочечников.

Микроскопическая оценка гистологических срезов тимуса показала, что у контрольных животных дольки отделены друг от друга тонкими прослойками соединительной ткани, жировая ткань практически отсутствует. В дольках отмечается значительное преобладание коркового вещества над мозговым, прослеживается четкая граница между корковым и мозговым веществом, лимфофагоцитоз в дольках выражен незначительно, слоистые тельца в мозговом веществе единичны (рис. 2, а).

У животных 3-й группы по сравнению с контрольной группой корковое вещество истончается, содержание клеток в нем уменьшается, увеличивается распространенность лимфофагоцитоза с

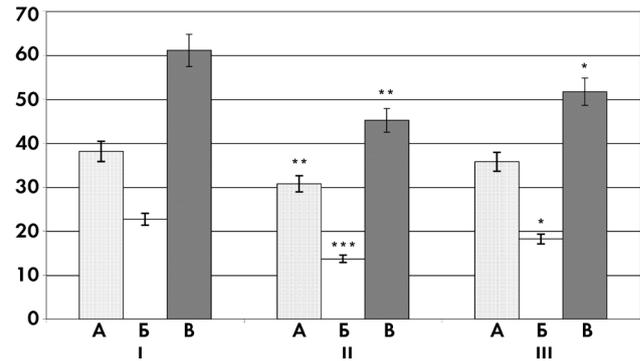


Рис. 1. Масса тела, абсолютная и относительная масса тимуса контрольных и экспериментальных (стрессированных) крыс.

По горизонтальной оси: I — 1-я группа — контрольные животные; II — 2-я группа — крысы, подвергнутые водно-иммерсионному стрессу; III — крысы, испытавшие психоэмоциональный стресс; по оси ординат — А — масса тела (г); Б — масса тимуса ( $г \times 10^{-2}$ ); В — относительная масса тимуса (%). Различия по сравнению с контролем значимы: одна звездочка — при  $P < 0,05$ ; две звездочки — при  $P < 0,01$ ; три звездочки — при  $P < 0,001$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

формированием картины «звездного неба», имеет место незначительное огрубение стромы, увеличение числа и площади слоистых телец.

Значительно большая глубина структурных изменений отмечается в тимусе животных 2-й экспериментальной группы. У них резко возрастает частота лимфофагоцитоза, в корковом веществе формируются очаги клеточного опустошения, граница между корковым и мозговым веществом стирается, дольки фиброзированы и разобщены толстыми прослойками соединительной ткани (см. рис. 2, б). Корково-мозговое отношение по сравнению с контролем у животных 2-й группы значимо уменьшается ( $4,2 \pm 0,4$  и  $1,26 \pm 0,19$  соответственно,  $P < 0,001$ ), в то время как в 3-й группе оно составляет  $2,24 \pm 0,28$  ( $P < 0,01$ ). Между экспериментальными группами различие данного показателя также значимо ( $P < 0,01$ ).

На срезах тимуса контрольных животных  $CD8^+$ -тимоциты густо населяют субкапсулярную и среднюю зоны коркового вещества, плотность их распределения уменьшается по направлению к мозговому веществу, в котором их число значительно меньше, чем в корковом (см. рис. 2, в). У экспериментальных животных разрежение клеток во многом связано с утратой именно  $CD8^+$ -клеток, которые прежде всего покидают среднюю зону коркового вещества — место сосредоточения двойных позитивных тимоцитов. В мозговом веществе число иммунореактивных клеток также уменьшается после стресса, что, вероятно, связано с «недопоставками»  $CD8^+$ -клеток из коркового вещества. Цитоплазма множества

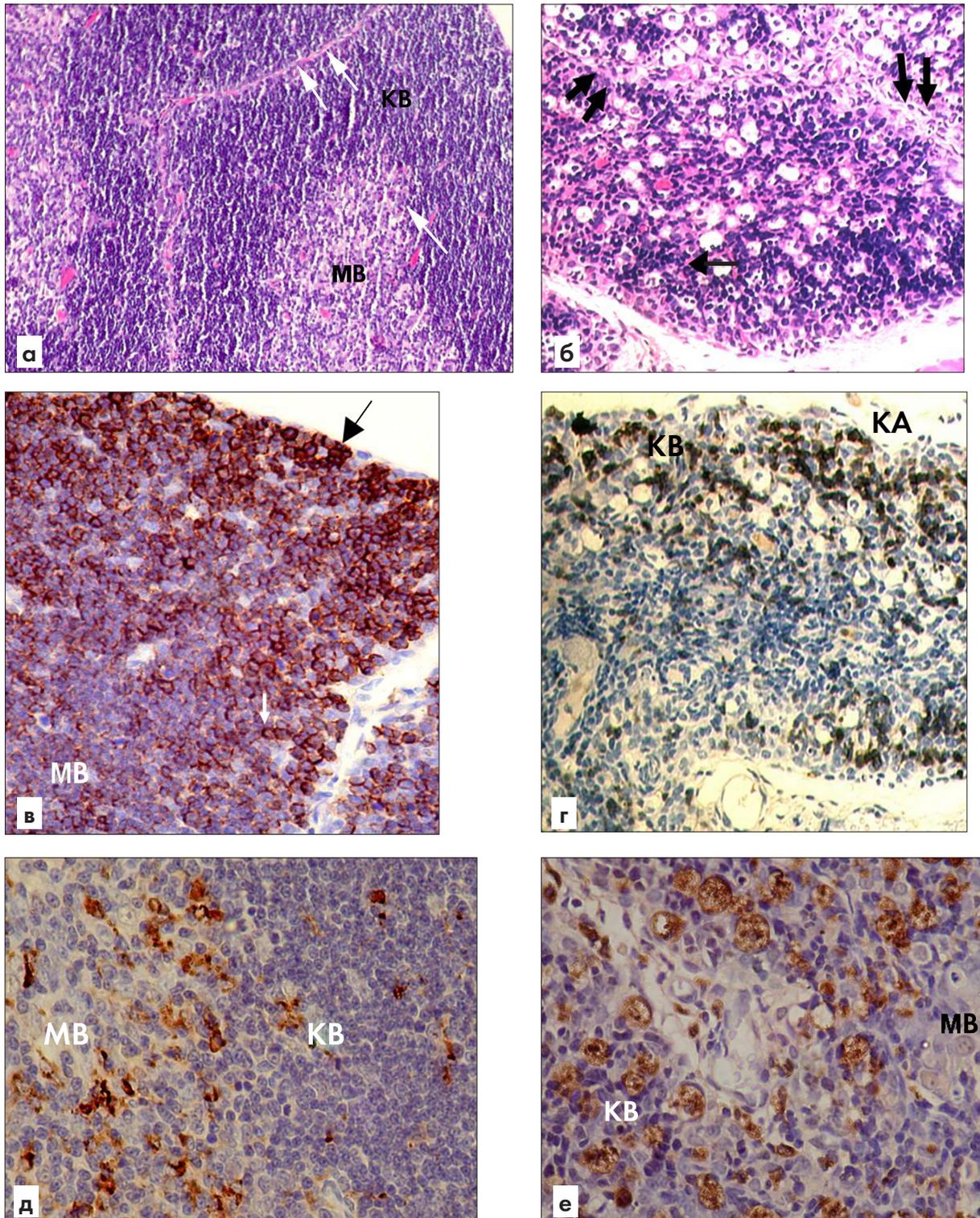


Рис. 2. Тимус 27-дневных крыс — контрольных (а, в, д) и после водно-иммерсионного стресса (б, г, е).

а — граница между корковым веществом (КВ) и мозговым веществом (МВ) четкая (стрелка), плотность расположения тимоцитов значительно выше в КВ, чем в МВ, между дольками тонкие прослойки соединительной ткани (две стрелки); б — граница между КВ и МВ отсутствует, уровень лимфофагоцитоза в КВ очень высок (стрелка), дольки разделены широкими прослойками соединительной ткани (две стрелки); в — в субкапсулярной зоне (черная стрелка) плотность расположения CD8a-иммунореактивных клеток высокая, по направлению к МВ она снижается. В иммунореактивных клетках (белая стрелка) имеется отчетливый диаминобензидин-позитивный ободок, свидетельствующий о поверхностной экспрессии антигена; г — в КВ разрежение иммунопозитивных клеток. CD8<sup>+</sup>-клетки расположены в основном в субкапсулярной зоне и средней зоне КВ. Граница между КВ и МВ размыта. КА — капсула; д — ED1-иммунореактивные клетки, в КВ расположены преимущественно поодиночке, их значительно меньше, чем в МВ, где они образуют группы; е — число ED1-иммунореактивных клеток в КВ значительно больше, чем в МВ. а, б — окраска гематоксилином-эозином; в, г — реакция на CD8a с докраской гематоксилином; д, е — реакция на ED1 с докраской гематоксилином. Ув.: а — 40; б-д — 100; е — 400.

корковых макрофагов заполнена иммунореактивными апоптозными тельцами. Наибольшая утрата иммунореактивных клеток отмечается у животных 2-й группы, у которых окрашенной остается узкая прерывистая полоса клеток в средней зоне коркового вещества (см. рис. 2, г). Удельная и численная плотность  $CD8^+$ -клеток в корковом веществе значительно снижается по сравнению с контролем в обеих экспериментальных группах (рис. 3, а). Между экспериментальными группами имеется значимое различие численной плотности иммунореактивных клеток ( $P < 0,01$ ).

Выявление маркера зрелых макрофагов — ED1 — показало, что иммунореактивных клеток в корковом веществе контрольных животных значительно меньше, чем в мозговом веществе (см. рис. 2, д). У животных 3-й группы число  $ED1^+$ -клеток в корковом веществе существенно увеличивается, однако остается сравнительно меньшим, чем в мозговом веществе. Резкое увеличение числа иммунопозитивных клеток отмечается в тимусе животных 2-й группы — лишь здесь число  $ED1^+$ -клеток коркового вещества превышает таковое в мозговом веществе (см. рис. 2, е). Количественная оценка показала в обеих экспериментальных группах высоко значимое различие удельной площади, численной плотности и размеров иммунореактивных клеток по сравнению с контрольной группой (рис. 4). Кроме того, имело место значимое различие численной плотности и удельной площади между двумя экспериментальными группами ( $P < 0,001$  и  $P < 0,01$  соответственно).

При окрашивании тимуса животных 1-й группы на PCNA выявлены большие индивидуальные различия в плотности расположения иммунопозитивных клеток в корковом веществе органа, в то время как в мозговом веществе они невелики. У животных 2-й группы стресс приводит к снижению частоты обнаружения иммунопозитивных клеток в корковом веществе, менее выраженному у животных 3-й группы, где снижение не достигает уровня значимости (см. рис. 3, б).

Обсуждение полученных данных. Проведенное количественное гистологическое и иммуногистохимическое исследование показало наличие у животных в возрасте, соответствующем переходу на самостоятельное питание, резкой акцидентальной инволюции тимуса при действии как физического стрессора (погружение в воду), так и чисто психологического в модели «стресса ожидания». В литературе имеются указания на большее иммуномодулирующее действие «стресса ожидания» по сравнению с действием

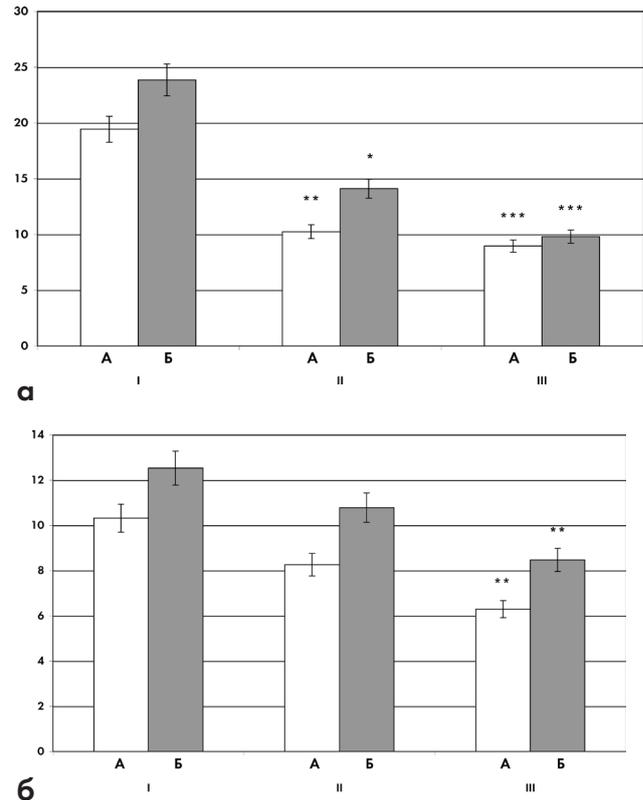


Рис. 3. Сравнительная количественная характеристика распределения  $CD8a^+$ -тимотоцитов (а) и  $PCNA^+$ -клеток (б) в корковом веществе тимуса крыс подсосного периода в норме и при хроническом стрессе.

По горизонтальной оси: I — контрольная группа; II — группа крыс, испытавших психоэмоциональный стресс (стресс ожидания); III — группа крыс, подвергнутых иммерсионному стрессу; А — удельная площадь (%); Б — численная плотность (на  $1 \text{ мм}^2 \times 10^3$ ); различия по сравнению с контролем значимы: одна звездочка — при  $P < 0,05$ ; две звездочки — при  $P < 0,01$ ; три звездочки — при  $P < 0,001$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

физического стрессора [17], однако наши данные показали, что в данной возрастной группе иммуносупрессивное действие физического стрессора было сильнее, чем психоэмоционального, хотя и последний вызывал глубокие изменения в тимусе, ассоциируемые с подавлением иммунного ответа. Акцидентальная инволюция тимуса считается, в противоположность возрастной инволюции, обратимой, однако столь глубокие изменения иммуноархитектоники тимуса могут потребовать значительного времени для ее восстановления, способствуя резкому ослаблению иммунного ответа и делая растущий организм уязвимым для инфекционных агентов.

Сохраняется немало противоречий в понимании как направленности спровоцированных стрессом иммунных сдвигов, так и механизмов их формирования [6–8], которые в большинстве исследований изучались с применением суспензий

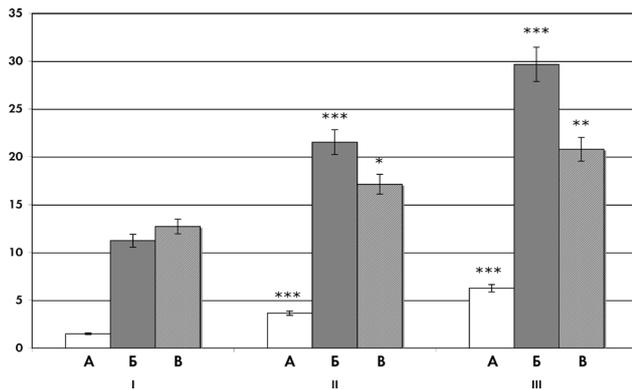


Рис. 4. Сравнительная количественная характеристика распределения ED1<sup>+</sup>-клеток в корковом веществе тимуса крыс подсосного периода в норме и при хроническом стрессе.

По горизонтальной оси: I — контрольная группа; II — группа крыс, испытывавшая психоэмоциональный стресс (стресс ожидания); III — группа крыс, подвергнутых иммерсионному стрессу; А — удельная площадь (%); Б — численная плотность (на 1 мм<sup>2</sup>×10<sup>2</sup>); В — площадь клетки на срезе (мкм<sup>2</sup>). Различия по сравнению с контролем значимы: одна звездочка — при P<0,05; две звездочки — при P<0,01; три звездочки — при P<0,001. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

иммуноцитов и их культур. Поскольку органы иммунной защиты отличаются высокой степенью компартментализации, именно комплексный количественный иммуногистохимический анализ субпопуляций лимфоцитов как на территории самого тимуса, так и на территории периферических лимфоидных органов, Т-зависимые зоны которых заселяются тимусными иммигрантами, открывает новые возможности в исследовании проблемы постстрессовой иммуносупрессии.

Известно, что при хроническом стрессе имеет место уменьшение числа предшественников Т-лимфоцитов в красном костном мозгу и снижение уровня их хемоаттрактантов в тимусе [7], что способствует гипоплазии органа. Еще одним механизмом акцидентальной инволюции считается усиление миграции тимоцитов из тимуса в кровь и периферические иммунные органы [11]. Ранее с применением иммуногистохимических методов исследования было показано, что при хроническом стрессе не наблюдается увеличения числа ранних тимусных иммигрантов (Thy1.1<sup>+</sup>-клеток) в периферических органах иммунной защиты, более того, отмечается уменьшение содержания этой фракции Т-лимфоцитов по сравнению с возрастным контролем [2]. Эти обстоятельства позволяют предположить, что на ранних этапах постнатального онтогенеза основными механизмами инволюции тимуса при хроническом стрессе являются избыточная гибель двойных позитивных тимоцитов и торможение их пролиферации.

Таким образом, предпринятая нами комплексная оценка иммуноархитектоники тимуса экспериментальных животных выявила некоторые важные тенденции относительно развития стрессиндуцированной иммуномодуляции в растущем организме при хроническом действии физических и эмоциогенных стрессоров, которые целесообразно учитывать при разработке методов профилактики постстрессовой иммуносупрессии с учетом возраста организма и типа стрессорного агента. В растущем организме возраст перехода на самостоятельное питание является очень чувствительным к иммуносупрессивному действию хронического стресса, вызывающего резкую акцидентальную инволюцию тимуса; более глубокие изменения иммуноархитектоники органа отмечаются при действии физических стрессоров по сравнению с чисто психоэмоциональными. По данным количественного иммуногистохимического анализа, среди механизмов инволюции тимуса при хроническом стрессе в растущем организме важное значение имеют избыточный апоптоз двойных позитивных Т-лимфоцитов коркового вещества и угнетение пролиферации корковых тимоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г., Волкова О.В., Гриневич В.В. и Ресненко А.Б. Эволюционные аспекты стрессорной реакции. Вестн. РАМН, 2002, № 6, с. 24–27.
2. Капитонова М.Ю., Уллах М., Аснизам Асари М. и др. Динамика Thy-1 лимфоцитов в иммунных органах растущего организма при хроническом стрессе. Int. J. Immunorehabilitation, 2003, v. 5, № 2, p. 147–148.
3. Петров В.И., Григорьев И.А., Сергеев В.С. и Зарецкий Д.В. Особенности поведения крыс с различной генетической устойчивостью к стрессу. Бюл. exper. биол., 1998, т. 125, № 4, с. 420–424.
4. Сапин М.Р. и Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М., Джангар, 2000.
5. Судаков К.В. Новые акценты классической концепции стресса. Бюл. exper. биол., 1997, т. 123, № 2, с. 124–130.
6. Archana R. and Namasivayam A. Acute noise-induced alterations in the immune status of albino rats. Ind. J. Physiol. Pharmacol., 2000, v. 44, №1, p. 105–108.
7. Dominguez-Gerpe L. and Rey-Mendez M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. BMC Immunol, 2001, v. 2, № 1, p. 7.
8. Engler H. and Stefanski V. Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. Psychoneuroendocrinology, 2003, v. 28, № 8, p. 951–969.
9. Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. Brain Behav. Immun., 2005, v. 19, № 1, p. 3–11.

10. Obminska-Mrukowicz B. and Szczypka M. Influences of DTC and zinc supplementation on the cellular response restoration in restrained mice. *J. Vet. Sci.*, 2005, v. 6, № 1, p. 25–32
11. Padgett D.A. and Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.*, 2003, v. 24, № 8, p. 444–448.
12. 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.
13. Pijlman F.T., Wolterink G. and van Ree J.M. Cueing unavoidable physical but not emotional stress increases long-term behavioural effects in rats. *Behav. Brain Res.*, 2002, v. 134, № 1–2, p. 393–401.
14. Polak J.M. and Van Noorden S. Introduction to immunohistochemistry. 3rd edition. Oxford, Bios Scientific Pub., 2003.
15. Posevitz V., Benyhe S., Duda E. and Borsodi A. Restraint stress and anti-tumor immune response in mice. *Acta Biol. Hung.*, 2003, v. 54, № 2, p. 167–176.
16. Pruett S.B. Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. *Int. Immunopharmacol.*, 2001, v. 1, № 3, p. 507–520.
17. Yamamotova A., Starec M., Holecek V. et al. Anticipation of acute stress in isoprenaline-sensitive and — resistant rats: strain and gender differences. *Pharmacol. Toxicol.*, 2000, v. 87, № 4, p. 161–168.

Поступила в редакцию 02.03.2006 г.  
Получена после доработки 10.04.2006 г.

## ACCIDENTAL THYMIC INVOLUTION IN THE GROWING ORGANISM UNDER THE EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF STRESSORS

*M.Yu. Kapitonova, S.L. Kuznetsov, S.V. Klauchek,  
Z.I. Mohd Ismail, M. Ullah and O.V. Fedorova*

Using the quantitative immunohistochemistry, the immunomodulatory effect of different types of stressors (physical and psychoemotional) on the thymus of growing experimental animals was assessed. Sprague-Dawley rats aged 21 day were exposed either to physical (water immersion) or emotional «expectation» stress for 5 hours daily during 7 consecutive days. After the final exposure to stress, animals were sacrificed, thymus was obtained for weighting and was processed for routine histology and immunohistochemistry (CD3, CD8, ED1, PCNA) with subsequent automatic image analysis. The finding obtained have demonstrated severe accidental thymic involution in both groups of experimental animals, which was more prominent under the effect of the physical stressor as compared to «purely» psychoemotional stressor. The major factors of poststress thymic hypoplasia were the increased apoptosis of the cortical thymocytes and inhibition of their proliferation, but not their increased transport to peripheral immune organs.

**Key words:** *thymus, accidental involution, immunohistochemistry, physical stress, psychoemotional stress.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Department of Physiology, Volgograd State Medical University; Department of Histology, Cytology and Embryology, Moscow I.M. Sechenov State Medical Academy; Department of Anatomy, University Sains Malaysia, Kota Bharu, Malaysia.