

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

Чернов Дмитрий Александрович

**ИММУНОМОРФОЛОГИЯ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ГОМО- И ГЕТЕРОТИПИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ НА РАЗНЫХ
ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН, д.м.н.
профессор **Кузнецов Сергей Львович**

Москва 2018 г

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА	
1.1. Иммуноморфология и гистофизиология селезенки как крупнейшего периферического органа иммуногенеза	13
1.1.1. Иммуноархитектоника и функции белой пульпы и стромальной зоны селезенки	14
1.1.2. Микроморфология и иммуногистохимическая характеристика В-клеточного субкомпартамента белой пульпы	15
1.1.3. Микроморфология и иммуногистохимическая характеристика Т-клеточного субкомпартамента селезенки	19
1.2. Иммуноархитектоника красной пульпы селезенки. Взаимоотношение лимфоидных и макрофагальных клеток	26
1.3. Особенности морфологии селезенки и ее компарментов на разных этапах раннего постнатального онтогенеза. Онтогенетическая опосредованность изменений стромально-паренхиматозных взаимоотношений в селезенке	29
1.4. Изменения стромальных и паренхиматозных элементов красной и белой пульпы. Адаптационные перестройки в селезенке при хроническом действии различных по характеру стрессоров в различные периоды постнатального онтогенеза	39
1.4.1. Стрессассоциированная иммуномодуляция с учетом паттерна активации гипоталамо – гипофизарно – адренокортикальной оси. Нейроиммуноэндокринные последствия и изменения иммуноморфологии селезенки при воздействии различных моделей стресса	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	50

3.1. Морфометрический анализ селезенки крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза при воздействии гомо- и гетеротипического стресса	50
3.2. Имидж анализ селезенки крыс разных возрастных групп при воздействии гомо- и гетеротипического стресса	54
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	66
Выводы	79
Практические рекомендации	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	81
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	82

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Широкий диапазон иммуномодулирующих эффектов стресса от стимулирующего до глубокого угнетающего действия на иммунную систему организма человека и экспериментальных животных показано в многочисленных исследованиях последних лет [Dhabhar, 2014; Marques, 2014; Nicolaidis, 2015]. Вектор стресс-ассоциированной иммуномодуляции зависит от многих факторов, как внешних, так и внутренних, среди которых ведущими внешними факторами считаются продолжительность и тип стрессорного воздействия, а внутренними – возраст, пол испытуемого, тип приспособительного поведения и предыдущий опыт стрессорных экспозиций [Costa, 2010; Gądek-Michalska, 2013; Oster, 2014].

Известно, что почти все клеточные элементы, участвующие как во врожденном, так и приобретенном иммунитете, подвержены возрастному ремоделированию [Stojik, 2013]. Действие на организм любых иммуномодулирующих факторов, в том числе таких, как хронический стресс, во время активного роста, способствует наложению возрастных изменений на индуцированные сдвиги, что может оказать драматическое действие на иммунный ответ. Принято считать, что хронический стресс является иммунодепрессивным, однако механизмы иммуносупрессии по-прежнему нуждаются в дальнейшем изучении, что даст возможность разрабатывать адресные фармакологические или биоповеденческие методы минимизации иммуносупрессивных последствий стресса [Ahmad, 2014; D.Hu et al., 2014; Li 2014].

В последнее время появился ряд работ, посвященных изучению влияния хронического гетеротипического стресса, т.е. стрессорного воздействия сменяющимся стрессором [Kopp, 2013; Vabb, 2014; Zhang, 2014], затрагивающего главным образом нейроэндокринную систему. Продемонстрировано, что активация гипоталамо-гипофизарно-

адренкортикальной оси при повторном действии гомотипического стресса снижается, а гетеротипического – напротив, усиливается [Gagliano 2014].

Однако сведений о влиянии гетеротипических стрессоров на лимфоидные органы на разных этапах постнатального онтогенезе 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 [J.O Duarte et al., 2015, E.Chauhan et al., 2015.].

Подавляющее большинство подробных исследований выполнено с применением иммунологических методов исследования, позволяющих определять популяционный состав клеток крови, в то время как гистологические исследования данной проблемы проводились с применением преимущественно рутинных методов, не позволяющих оценить тонкие изменения в компартментах иммунных органов и определить их механизмы.

Селезенка является периферическим органом иммуногенеза. Существование в ней двух принципиально различных зон – красной и белой пульпы, а в последней Т- и -зон с их различными компартментами (периартериальные лимфоидные влагалища, лимфоидные узелки, маргинальная зона), различных по строению и функции, делает ее иммуногистохимическую характеристику весьма информативной в плане оценки иммунного статуса организма. До сих пор изучение этого органа при стрессе при действии повторяющегося и варьирующих стрессоров с применением современных методов количественной иммуногистохимии не проводилось, хотя именно оно может помочь раскрыть закономерности стресс-ассоциированных иммуномодуляционных сдвигов в организме: как стероид-зависимых, так и независимых.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является сравнительная оценка иммуномодулирующего действия стресса на морфологию селезенки при действии гомо- и гетеротипических стрессоров в различные возрастные периоды до наступления половой зрелости у крыс.

Задачи исследования

1. Провести на гистологических срезах селезенки неполовозрелых крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза иммуногистохимические реакции на маркеры дендритных и лимфоидных клеток, пролиферации и апоптоза с последующим анализом изображения.
2. Изучить изменение морфометрических показателей популяций Т- (CD8+, CD4+, CD90+) и В-клеток (CD20+) в селезенке крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза, вызванные гомо- и гетеротипическим стрессом
3. Выявить особенности стресс-ассоциированной динамики популяций стромальных клеток (OX-62- и белок S100- иммунопозитивных) в селезенке крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза, вызванные гомо- и гетеротипическим стрессом
4. Для выяснения механизмов стресс-ассоциированной динамики популяций лимфоидных и дендритных клеток провести анализ содержания PCNA- и каспаза-3-иммунопозитивных клеток в селезенке крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза, вызванные гомо- и гетеротипическим стрессом
5. Провести сравнительную микрофологическую и иммуногистохимическую оценку хронического действия гомо- и гетеротипических стрессоров на селезенку у неполовозрелых крыс в разные возрастные периоды

Научная новизна

Впервые проведена сравнительная иммуногистохимическая оценка хронического действия гомо- и гетеротипических стрессоров на селезенку у неполовозрелых крыс в разные возрастные периоды (инфантильный и перипубертатный периоды онтогенеза).

Разработан методический подход, позволяющий провести комплексную оценку хронического действия стрессоров на периферическое звено иммуногенеза - селезенку неполовозрелых крыс в разные возрастные периоды.

Впервые получены данные количественного иммуногистохимического метода исследования с последующей цифровой обработкой изображения позволяющего определить степень постстрессовой иммуномодуляции, развивающейся при хроническом действии стресса на разных этапах раннего постнатального онтогенеза.

Определены особенности стресс-ассоциированной динамики CD8⁺, CD4⁺, CD90⁺, CD20⁺ субпопуляций лимфоцитов, OX-62- и белок S100-иммунопозитивных клеток, а также PCNA- и каспаза-3- иммунопозитивных клеток селезенки крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза, вызванные хроническим гомо- и гетеротипическим стрессом.

Показано, что изменения, затрагивающие популяции лимфоидных и стромальных клеток в селезенке, а также интенсивность пролиферации и апоптоза иммуноцитов в разные периоды раннего постнатального онтогенеза при хроническом действии гетеротипических стрессоров различаются и превосходят по значимости изменения при гомотипическом стрессе.

Полученные результаты демонстрируют, что нейроэндокринные и иммунные изменения, опосредованные различными видами стресса, накладываются на сложные возрастные перестройки органов иммунной и эндокринной систем, наблюдаемые до наступления половой зрелости, что формирует отличающиеся иммуномодуляционные изменения при гомо- и

гетеротипическом стрессе на разных этапах раннего постнатального онтогенеза.

Теоретическое и практическое значение исследования

Научные положения и выводы диссертационного исследования существенно расширяют представления и о механизмах и последствиях иммуносупрессивного действия хронического стресса на селезенку крыс раннего постнатального периода онтогенеза.

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. Диапазон этих различий связан с возрастными особенностями активации гипоталамо- гипофизарно-адренокортикальной оси при хроническом стрессе.

Проведенное исследование показало наличие иммуносупрессивных изменений в селезенке у неполовозрелых крыс, состав и выраженность которых различаются у животных разных возрастных групп (инфантильного и перипубертатного возраста) при хроническом действии гетеротипических стрессоров по сравнению с гомотипическим стрессом.

Полученные данные могут использоваться при разработке адресных мер профилактики иммуносупрессивных нарушений в растущем организме, пережившем хроническое действие гомо- или гетеротипических стрессоров. Результаты диссертационного исследования могут применяться в учебном процессе и быть использованы при написании учебных пособий по клеточной биологии, цитологии, гистологии, иммуноморфологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Стресс-ассоциированные изменения в селезенке растущего организма при хроническом действии гомо- и гетеротипических стрессоров различаются

динамикой клеточных популяций лимфоцитов и дендритных клеток, уровнями апоптоза и пролиферации клеток в ее Т- и В-зонах.

2. Диапазон этих различий имеет возрастные закономерности, связанные с особенностями активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси при хроническом стрессе в различные возрастные периоды до наступления половой зрелости.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе получены автором самостоятельно. Автором лично проведены морфологические, гистохимические и морфометрические исследования, выполнены статистическая обработка, анализ и трактовка полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации, подготовлены научные публикации и доклады.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации отвечают паспорту специальности - 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Публикации и апробация материалов диссертации

Материалы диссертации докладывались на итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, 2005, 2008, 2009, 2014 гг. , The 24th Meeting of the Malaysian Society of Physiologists and Pharmacologists, Shah Alam, June 2010; Proceedings of the 6th APICA, Surabaya, Indonesia, July 2011

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе - 4 (2- оригинальных, 2- обзорных) в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 3 публикации в зарубежных изданиях.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего российских и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 9 рисунками.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 48 крысах породы Спрег-Доули в возрасте 20 и 45 суток, что соответствовало инфантильному и перипубертатному периодам постнатального развития. На момент окончания эксперимента возраст был 28 и 53 суток соответственно [151]. В каждой возрастной группе, включающей 24 особи, животных подразделяли на 3 подгруппы: контрольную и 2 экспериментальные для моделирования хронического гомотипического и гетеротипического стресса [66].

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 °С. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре +20...20 °С с доступом к воде и пище *ad libitum*. Экспериментальных животных ежедневно на протяжении 9 суток 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 PC 10) - ядерного антигена пролиферирующих клеток (AbDSerotec, США, MCA 1558); 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, MCA 1029); CD20 (клон R1N- 9D3) - маркеру пре- и зрелых В-лимфоцитов (AbDSerotec, MCA#1432).

Для визуализации применяли стрептавидин-биогин - 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, среднеквадратическое отклонение, ошибку репрезентативности. Оценку значимости различий сравниваемых величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости считали $p < 0,05$.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

1.1. Иммуноморфология и гистофизиология селезенки как крупнейшего периферического органа иммуногенеза.

Самым крупным лимфоидным органом человеческого организма является селезенка. Она вносит большой вклад в развитие и поддержание клеточного и гуморального иммунного ответа, врожденного и приобретенного иммунитета, количественный и качественный состав иммунных клеток крови, лимфы и других лимфоидных органов.

Микроархитектоника селезенки человека описана в многочисленных исследованиях по гистофизиологии и иммунопатологии лимфоидных органов, однако до сих пор представления о микроструктуре и гистофизиологии селезенки остаются весьма противоречивыми [52,56,80,134,175].

Схожей чертой периферических лимфоидных органов, и селезенки в том числе, считается их компартментализированное строение, обеспечивающее возможность эффективного иммунного ответа. Наличие в селезенке двух принципиально отличающихся зон – красной и белой пульпы, а в последней Т- и В – зон с их различными компартментами (периартериальные лимфоидные влагалища, лимфоидные узелки, маргинальная зона), различных по строению и функции, делает тонкую иммуногистохимическую структуру селезенки весьма информативной в плане оценки иммунного статуса организма.

Понимание микроморфологии этого органа чрезвычайно важно не только для теоретической, но и для практической медицины, поскольку селезенка является важнейшим органом рециркуляции лимфоцитов у человека.

После появления методов иммуногистохимического выделения стромальных и гематогенных клеток дифференцировать микроархитектонику иммунных органов, включая селезенку, стало легче. Микроморфологическая компартментализация, микроциркуляторное русло и функциональное состояние селезенки можно информативно оценить с применением различных моноклональных антител.

У человека и грызунов селезенка, как крупнейший периферический орган иммуногенеза, имеет ряд важных отличительных особенностей в сравнении с другими иммунными органами [1,39,80,147,168].

1.1.1. Иммуноархитектоника и функции белой пульпы и стромальной зоны селезенки.

Белой пульпой селезенки называется скопление лимфоидной ткани, состоящей из лимфоцитов, расположенных около артерий. Объем белой пульпы составляет от 5 до 20% массы органа. Уникальное кровоснабжение селезенки определяет особенности ее гистофизиологии. Многочисленные разветвления селезеночной артерии вкуче составляют сосудистую сеть белой пульпы, в которой Т-клетки образуют периартериальные лимфоидные влагалища (ПАЛВ), заселенные Т-лимфоцитами, располагающимися среди интердигитирующих клеток, экспрессирующих главный комплекс гистосовместимости, участвующий в инициировании Т-клеточного иммунного ответа.

Лимфоидные узелки представлены скоплениями В-лимфоцитов по ходу сосудистой сети. В узелке находится центр размножения— место, где происходит пролиферция В-лимфобластов после на антигенной стимуляции. Вокруг лимфатического узелка выделяют зону, где лимфоциты покидают мелкие кровеносные капилляры и поступают в маргинальную зону селезенки. Именно из этой маргинальной зоны Т-лимфоциты мигрируют к ПАЛВ, а В-лимфоциты попадают в лимфатические узелки. Обе зоны содержат также

большое количество антиген-презентирующих клеток и макрофагов [1,10,56,127,134,144]

Ширина маргинальной зоны вокруг структур белой пульпы составляет около 100 мкм. В этой зоне находятся плазмоциты, Т- и В-клетки (дифференцирующиеся для распознавания тимус-независимых антигенов) и интердигитирующие клетки (антиген-презентирующие). Кровь, поступающая в краевую зону, течет через богатую макрофагами область. Макрофаги фагоцитируют из крови антигены и другие чужеродные частицы. [127,134,147,169].

Краевая или маргинальная зона, осуществляющая взаимодействие между красной и белой пульпой является уникальным компартментом, разделяющим белую пульпу и красную пульпу. В маргинальной зоне кровотока происходит через открытую систему ретикулярных клеток и волокон, в которой расположены многочисленные миелоидные и лимфоидные клетки, взаимодействующие с популяцией В-клеток. Они располагаются только в маргинальной зоне и активируются при появлении специфического антигена. Функционирование маргинальной зоны связано с наличием В-клеток. Взаимодействие в маргинальной зоне В-клеток и макрофагов обеспечивает адекватный баланс между врожденным и приобретенным иммунитетом. Такая стратегическая комбинация локализованных здесь клеток является важнейшим фактором защиты от патогенов гематогенного происхождения [56,127,144].

Несколькими исследователями описаны специальные стромальные клетки в маргинальной зоне, при этом отмечена экспрессия гладкомышечного альфа-актина, цитокератина 8 и/или 18 и гладкомышечного миозина и Thy-1. CD4+, выявлены различия в распределении CD4+ и CD8+ Т-клеток [11,193]. Несмотря на то, что состав В-клеток маргинальной зоны исследован в полной мере, в отношении микроанатомического расположения этих клеток существует много противоречий, поскольку маргинальную зону часто смешивают с перифолликулярной зоной. Вероятно, это связано с тем, что

значительное количество В-лимфоцитов заселяет именно зону около фолликул, и тогда различия между этими структурами трудноопределимы. Являясь В-зоной, маргинальная зона содержит определенное количество CD4+лимфоцитов. Эту точку зрения разделяют большинство авторов, которые исследовали микроархитектонику селезенки [65,70,132].

Таким образом, маргинальная зона является динамичной структурой, в которой перемещение и задержка В-клеток требует специфического взаимодействия В-клеток и макрофагов маргинальной зоны [169].

1.1.2. Микроморфология и иммуногистохимическая характеристика В-клеточного субкомпартамента белой пульпы.

Как уже отмечалось, лимфоидные узелки В-клеточного субкомпартамента заселяются В-клетками, их развитие инициируется в костном мозге и затем через недостаточно зрелые переходные формы они переходят в селезенку, где и завершают созревание. Без герминативных центров лимфоидные узелки называются первичными, с герминативными центрами - вторичными [129, 143]. Представляется, что основное назначение герминативных центров – это продукция В-лимфоцитов памяти, однако главная функция первичных фолликулов до сих пор остается не вполне ясной.

Вторичные фолликулы образуются в ответ на действия антигенов и являются зонами формирования плазматических клеток и В-клеток памяти. Эти клетки, присутствующие в центрах размножения, первоначально активизируются не в фолликулах, а в Т-зонах при участии Т-лимфоцитов, перемещающихся из региона своего образования к вторичному фолликулу. В герминативных центрах присутствуют несколько зон: базальная и апикальная светлые зоны и темная зона. Находящиеся вне стадии пролиферации В-клетки попадают в светлую зону, а темная зона центра размножения представляет собой интенсивно пролиферирующие компактно расположенные В-лимфоциты. Такие клетки называются центробластами, они мигрируют во внутреннюю (базальную) светлую зону, где начинают экспрессировать

поверхностный иммуноглобулин, изменяют класс экспрессируемого иммуноглобулина и становятся центроцитами. Центроциты вследствие гипермутации становятся способными к синтезу антител [39,105].

Фолликулярные дендритные клетки (ФДК) представляют собой специализированные нелимфоидные клетки, имеющие дендритные отростки, формирующие специализированные сети, активно взаимодействующие с В-лимфоцитами, которые располагаются в ячейках этой сети. ФДК являются доминирующим стромальным клеточным элементом в лимфоидных узелках. Иммунный ответ, связанный с образованием значительного числа антител к Т-зависимым антигенам во многом связан с ФДК, производящими захватывание и длительное сохранение связи с иммунными комплексами. ФДК расположены в светлых центрах лимфоидных фолликулов и образуют трехмерную сеть – ретикулум. Они характеризуются способностью удерживать и процессировать иммунные комплексы на своей поверхности достаточно длительное время [30,91,131].

Во многих исследованиях показано, что формирование ФДК связано с присутствием В-клеток и секретируемых ими цитокинов, но практически независимо от Т-клеток. Последующие работы продемонстрировали, что именно с Т-клеткам связана регуляция активности ФДК [142]. До настоящего времени не выяснено, являются ли эти клетки мезенхимальными или относятся к костномозговым (миелоидным) клеткам. Клетки, которые не экспрессируют необходимый поверхностный иммуноглобулин, подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами. [156].

Центры размножения появляются в В-клеточных лимфоидных фолликулах во время Т-зависимой выработки антител. После иммунизации одной дозой белкового антигена формирующиеся герминативные центры являются олигоклональными: в среднем три В-бласта колонизируют каждый фолликул. Эти бласты проходят через массивную клональную экспансию и активируют локальный гипермутационный механизм, действующий на их Ig-v гены.

В темной зоне герминативных центров располагаются активно пролиферирующие В-клетки, в противоположность ей светлая зона имеет полноценную сеть ФДК, способных к захвату и удерживанию антигенов на своей поверхности в течении нескольких месяцев. Антиген сохраняется в составе виде иммунного комплекса в непроцессированной форме, но он способен передаваться через ФДК В-клеткам, а те в свою очередь сами могут его процессировать и презентировать Т-клеткам [34,97,141].

Доказано, что агонистические антитела против CD137 (4-1BB) и Т-клеточного ко-стимулирующего рецептора, связанного с индукцией активности этого рецептора, эффективны в обеспечении Т-клеточного ответа, но эти же антитела они парадоксальным образом блокируют Т-зависимую иммунную реакцию и ингибируют синтез антител. CD137-медиированную суппрессию Т-зависимой выработки антител объясняют ингибированием Th-клеток связанным с активационно-зависимой гибелью клеток или увеличением активности CD11c+CD8+ Т-суппрессоров и деплецией В-клеток. В некоторых работах показано, что параллельная стимуляция CD137 значительно уменьшает активность ФДК в Т-клеточно-зависимой манере, это уменьшает их количество после формирования герминативных центров. Активация Т-клеток, таким образом, способствует изменению функциональной активности ФДК [38,81,131,142].

И фолликулярные клетки В-зон и интедигитирующие клетки Т-зон гибнут каспаза-3-медиированном апоптозом. Фолликулярные дендритные клетки функционируют более длительное время, сохраняя антиген до 12 месяцев. У ИДК короткий жизненный цикл – от полутора до трех дней, эти клетки погибают апоптозом, презентовав антиген Т-клеткам. Некоторые авторы предполагают, что фолликулярные дендритные клетки не костномозгового происхождения. Однако до сих пор не выяснено, связана ли деплеция дендритных клеток с уменьшением лимфоцитов или это противоположный процесс [122,161].

Однозначно, в значительном количестве работ показано, что основная функция ФДК – предотвращение апоптоза и поддержка активности В-клеток герминативных центров, но ФДК не влияют на их дифференцировку, в то время как активированные Т-клетки потенцируют дифференцирование В-клеток за счет предоставления цитокинов и различных мессенджеров [44,150,166].

Несмотря на обилие исследований, большое количество вопросов, остаются нерешенными. Прежде всего, это касается происхождения ФДК, которое до сих пор остается спорным. Предполагают, что их происхождение связано со стромальными костномозговыми клетками, возможно, лимфоидными или миелоидными клетками или локальными мезенхимальными предшественниками [30,105]. Одни авторы полагают, что ФДК влияют на дифференцировку центробластов в centroциты, другие исследователи считают, что это прерогатива Т-клеток.

Помимо этого, сохраняются противоречивые данные о роли ФДК в апоптозе В-лимфоцитов: ряд авторов считает, что они потенцируют В-клетки на гибель апоптозом, другие полагают, что они ограничивают апоптоз. Значение Т-клеток в этом процессе тоже представляется неоднозначным: с помощью CD40L они предотвращают апоптоз В-клеток, а с помощью CD95 – индуцируют его [142, 181,192]. Эти противоречия затрудняют понимание иммуномодуляторных процессов в организме, в частности, механизмов иммуносупрессивных сдвигов в селезенке при стрессе.

1.1.3. Микроморфология и иммуногистохимическая характеристика Т-клеточного субкомпартамента селезенки

Т-клеточный состав селезенки чрезвычайно разнообразен. Изменение Т-клеточного гомеостаза, в частности нарушение апоптоза Т-лимфоцитов, способствует инициации и пролонгации хронического воспалительного процесса. К настоящему времени расшифрованы механизмы изменения иммунной системы, приводящие к развитию аутоиммунных заболеваний,

доказано, что нарушения Т-клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий ведет к ускоренному старению иммунной системы, которое вносит свой вклад в развитие аутоиммунной патологии [70,102,149,173].

С целью сохранения гомеостаза существует увеличение количества CD4+ Т-лимфоцитов над CD8+ Т-лимфоцитами, которое запрограммировано «по умолчанию». Пролиферация CD4+ Т-клеток находится под контролем АПК, которые передают Т-клеткам информацию о чужеродных агентах. Дендритные клетки, распознающие ядерные структуры клеток бактерий, такие как липополисахариды, способствуют дифференцировке Th1-клеток. Распознавание нематодного паразита, грибковой инфекции, или холерного токсина позволяет дендритным клеткам запустить мощный Th2-клеточный ответ [136]. Однако представления о механизмах, посредством которых АПК стимулируют дифференцировку Т-хелперов, противоречивы. Считается, что важнейшим медиатором в этом процессе является И-12, а дифференцировка Th2 клеток происходит даже в отсутствие медиаторов, стимулирующих этот процесс. Некоторые авторы не согласны с таким представлением. Они предполагают, что важнейшим индуктором дифференцировки Th-2 клеток является И-4. При этом парадокс состоит в том, что именно Th2 клетки и являются главным продуцентом этого цитокина, а И-4, производимый нелимфоидными клетками, существенно не влияет на дифференцировку Th2-клеток. Возможно, что в отсутствие И-4 другие факторы, бактериальные или паразитарные, способны осуществлять подобные действия, однако тонкие механизмы этих процессов не до конца ясны [65,109,124,164].

Пройдя позитивную селекцию и избежав негативной селекции, наивные Т-клетки покидают тимус и экспрессируют рецепторы хоминга. Затем они мигрируют в селезенку и присутствуют в ней до момента контакта с АПК, которые несут фрагменты белков, распознаваемых их поверхностными Т-клеточными рецепторами. Если АПК активированы адекватно, наивные Т-клетки подвергаются клональной экспансии под влиянием разнообразных факторов, включая аутокринную секрецию И-2. По мере клональной

экспансии Т-клетки претерпевают гибель апоптозом, являющимся Fas– Fas-лигандным взаимодействием, призванным ограничить чрезмерный иммунный ответ [37, 141].

Избежавшие апоптоза Т-клетки, превращаются в клетки памяти, регулирующие клеточный иммунный ответ. Определенная часть эффекторных клеток экспрессирует тканеспецифические рецепторы хоминга. У некоторых клеток остается функционирующая часть специфических поверхностных цитокиновых рецепторов, таких как СС хемокиновый рецептор 7 [CCR7], эти клетки рециркулируют периферические органы иммуногенеза, включая селезенку. Эти клетки называются эффекторным пулом клеток памяти, основной функцией которого является быстрая амплификация ответа на воздействие известного антигена [126, 143]

Существует другой уровень регуляции генерации Т-клеток памяти через активную транскрипцию цитокиновых генов, приводящую к ингибированию генерации CD4⁺ Th1 клеток памяти в клетках, активно секретирующих IFN [30,65,128]. Между дендритными клетками и Т-лимфоцитами устанавливаются специфические взаимоотношения, в которых задействованы многочисленные адгезивные рецепторы и растворимые сигнальные молекулы, которые называются «иммунологическим синапсом». Итогом таких взаимодействий может быть либо развитие толерантности, либо запуск иммунной активации [169].

Относительный объем Т-клеточных компартментов, содержащих CD4⁺ и CD8⁺ клетки, у человека и у мыши характеризуется значительной генетической вариабельностью. Выявлены факторы транскрипции, влияющие на дифференцировку Т-клеток, среди которых STAT6, члены семейства NFAT, c-Maf и GATA3. Ген семейства Notch обеспечивает дифференцировку Т-хелперов. У крыс дифференцировано 4 гена Notch и 5 генов, кодирующих лиганды для этих генов из семейства Jagged (Jagged1 и Jagged2) и Delta (Dlk1, Dlk3, Dlk4) [65,163].

Дендритные клетки представляют собой самые эффективные АПК и являются единственным видом клеток, способным запустить первичный иммунный ответ. Они используют специфические наборы рецепторов для идентификации «своего» и «чужого», а также отслеживают «опасные» сигналы от микробных частиц, злокачественных и некротизированных клеток. На разных стадиях жизненного цикла дендритные клетки играют важнейшую роль в поддержании периферической толерантности по отношению к аутоантигенам и иницировании адекватного иммунного ответа [50, 54,149,171].

Как уже указывалось, фолликулярные дендритным клеткам принадлежит ключевая роль в контроле созревания В-клеток, изменении их изотипа, установления у В-клеток памяти. Эти функции связаны с длительным сохранением ФДК антигена в нативной форме. Но удерживая патогенные клетки, ФДК иногда становятся цистернами, сохраняющими их опасные свойства. Дендритные клетки экспрессируют CD68 и другие макрофагальные антигены [96,141].

Дендритные клетки селезенки несут маркеры: CD11с, OX6, OX62 и бывают двух типов. Среди дендритных клеток большая часть - это клетки I типа, они имеют типичное строение цитоплазмы, особый профиль и характеризуются экспрессией на своей поверхности CD11с. Для клеток II типа характерна способность экспрессировать OX62, небольшие размеры, незначительное количество тонких коротких отростков. Эти клетки выявляются во время прохождения через стенку сосудов. В-лимфоциты чаще взаимодействуют с дендритными клетками I типа [30].

Самым главным маркером дендритных интердигитирующих клеток является OX-62 – иммуноглобулин G1. Он является моноклональным антителом против вуалевых клеток лимфы. В селезенке эти клетки расположены в T-зонах (вокруг центральных артериол), рассеяны по красной пульпе, незначительное их количество содержит в маргинальная зона и по

периферия белой пульпы. В красной пульпе клетки более округлые, с более четкими контурами и окрашены более ярко, чем в белой пульпе [27,52,134].

Дендритные клетки селезенки, вероятнее всего, происходят из одной популяции предшественников: CD8alpha- дендритные клетки могут приобретать фенотип CD8alpha(+) в ходе дифференцировки с усилением экспрессии CD8alpha, DEC-205, и CD24 с одновременным уменьшением дифференцировки CD11b, F4/80 и CD4. Таким образом, CD8alpha(+) дендритные клетки происходят из CD8alpha(-) дендритных клеток; и CD8alpha(+) и CD8alpha(-) – это дендритные клетки одной популяции, но находящиеся различных стадиях дифференцировки. Так CD8alpha(+) дендритные клетки находятся на самой последней стадии зрелости дендритных клеток и выполняют важную роль в индукции Т-клеточного ответа, связанного с их антиген-презентирующим потенциалом, способностью кросс-примирования и экспрессии значительного числа важнейших цитокинов, необходимых для адекватного иммунного ответа [49,157].

В литературе имеются и другие представления о происхождении дендритных клеток селезенки. Так было продемонстрировано, что под воздействием ГМ-КСФ и ИЛ-4 моноциты получают способность дифференцироваться в дендритные клетки. При этом сначала они достигают в своей дифференцировке уровня незрелых дендритных клеток, которые имеют высокую активность в захвате антигена, его процессировании, однако обладающие низкой активностью в выработке ИЛ-12 и в стимулировании Т-клеток. Эти клетки достигают зрелости после воздействия различных мессенджеров, в частности, провоспалительных цитокинов TNF- α и ИЛ-1 β . Незрелые дендритные клетки больше способны захватывать антиген, а зрелые обладают большими возможностями процессировать антиген и усиливать экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD86. Подобный фенотип удобен для привлечения и активации Т-, В- и NK-клеток [109,146,154]. Такие представления согласуются с мнением других исследователей, которые при исследовании костномозговых предшественников моноцитов, макрофагов и

резидентных дендритных клеток селезенки продемонстрировали, что они с большой долей вероятности имеют общего предшественника, что укладывается в концепцию системы моноклеарных фагоцитов, к которой оба вида клеток относятся [18].

По другим данным, несмотря на то, что миелоидные предшественники легче дифференцируются в дендритные клетки, такие возможности есть и у лимфоидных предшественников, которые однако реализуются при определенных условиях (например, при дополнительных сигнальных взаимодействиях) [37,102].

Способность перемещенных лимфоидных клеток вызывать перераспределение клеток микроокружения у иммунодефицитных (SCID) мышей описана для фолликулярных дендритных клеток и ретикулярных клеток, идентифицируемых с помощью антител к WP-1 и RPSC-2 [85]. Предпочтение определенных классов лимфоцитов, представляющих индукционные молекулы, такие как LT / β 2 или TNF , специфично для некоторых видов лимфоидной ткани, так как отсутствие экспрессии этих молекул В-клетками приводит к ингибирующему воздействию на дифференцировку ФДК селезенки по сравнению с другими периферическими органами иммуногенеза.

Перенос различных лимфоидных клеток в одинаковых количествах может адекватно индуцировать реаранжировку IBL-11+клеток и стимулировать возникновение IBL-10hi клеток в фолликулярной области. Определенно, что эти клетки первоначально появляются в белой пульпе, периферической ее части, и у неиммунодефицитных новорожденных крыс, и у иммунодефицитных взрослых животных, но их последующая реаранжировка, не возможна в отсутствие зрелых лимфоцитов и поэтому она нарушена при иммунодефицитных состояниях. Не ясно, связано ли изменение IBL-11+клеток с их миграцией или с их разделением, определяемым лимфоцитарной колонизацией. Это заставляет сомневаться в наличии специфического Т- или В-клеточного запроса для формирования этих клеток,

в противовес первоначальной В-клеточно-зависимой дифференцировке ФДК [25,74].

Неспособность сформировать IBL-10hi фибробластический барьер на между Т- и В-зонами у Т-трансплантированных иммунодефицитных мышей скорее всего связана с отсутствием В-клеток. Поэтому, В-клетки хотя и являются эффективными индукторами их дифференцировки, вероятно ограничивают инфильтрацию этими клетками более глубоких частей фолликула, чего не наступает у иммунодефицитных животных. Дополнительное значение В-клеток возможно заключается в том, чтобы направить такого рода клетки в Т-зоны [74]. Таким образом, несмотря на то, что главные события могут быть скорректированы одним лишь трансфером В-клеток молодым иммунодефицитным мышам, становление оптимальной структуры требует наличия двух подтипов клеток с самогоранного периода. Для выявления схожести стромальных ретикулярных клеток, на которые оказывают воздействие лимфоидные клетки, и их взаимоотношений друг с другом в процессе онтогенеза, необходимы единые подходы к изучению разных подвидов ретикулярных клеток с применением батареи антител.

Тонкая организация различных компартментах белой пульпы человека не до конца установлена. В связи с этим представляет интерес исследование, в котором была выполнена трехмерная реконструкция серийных срезов селезенки, альтернативно окрашенных на CD3 и CD20. Результаты показывают на возможность прерывания Т-зоны селезенки человека В-клеточными фолликулами. Поэтому вполне вероятно, что в белой пульпе нет непрерывных ПАЛВ вокруг артериол. Т-лимфоциты могут окружать артериолу на некотором уровне, затем артериола способна пересечь фолликул без Т-клеточного окружения, и снова возвращаться в Т-зону. Т- и В-клеточные компартменты причудливо взаиморасполагаются в белой пульпе селезенки. Фибробласты Т-зон и CD4 (+) Т-лимфоциты могут располагаться в маргинальной зоне наподобие тончайшей прослойки по фолликулярной поверхности. В противоположность, IgD (++) В-клетки располагаются вдоль

поверхности Т-зоны, распространяясь от фолликулярной наружной маргинальной зоны [52,56,127].

Полученные результаты демонстрируют, что микроморфология белой пульпы селезенки у людей и грызунов существенно различается, что приводит к различиям в закономерностях иммиграции лимфоидных клеток и в первоначальных взаимодействиях между антиген-специфическими Т-и В-лимфоцитами. Нам было принципиально важно показать все нюансы этих отличий для того, чтобы с известной долей ограничений получить возможность экстраполировать на человека полученные нами результаты изучения иммуноархитектоники селезенки экспериментальных животных.

1.2. Иммуноархитектоника красной пульпы селезенки. Взаимоотношение лимфоидных и макрофагальных клеток

Красная пульпа селезенки представляет собой ее паренхиматозную часть – селезеночные тяжи, так называемые тяжи Бильрота, между которыми расположены селезеночные синусы. Рыхлая соединительная ткань, которая поддерживается ретикулярными волокнами, составляет основу красной пульпы селезенки.

Красная пульпа может функционировать как дополнительный миелопоэтический компартмент и служит выходным путем для большинства рециркулирующих клеток. Помимо этого, используя свои макрофагальные клетки она эффективно фагоцитирует различные антигены гематогенного происхождения и поврежденные эритроциты [96].

Селезенка имеет уникальный кровоток, сочетающий открытое и закрытое кровообращение. Ретикулярные волокна и фибробласты представляют открытую часть кровообращения в селезенке, она лишена эндотелия и получает кровь из терминальных артериол. Остальная часть сосудистой сети, включающая также синусы красной пульпы, формирует закрытую часть селезеночного кровотока. В синусах красной пульпы располагаются специфические прерывистые эндотелиальная выстилка и

базальная мембрана, благодаря которым эритроциты попадают из открытой циркуляции в ее паренхиматозную часть [10,39,160].

Позиционирование плазмоцитов в красной пульпе до конца не изучено. Их расположение в различных регионах контролируется хемокинами и адгезионными молекулами, экспрессируемыми клетками микроокружения органов иммуногенеза. Вклад стромальных клеток в миграцию и функционирование плазмоцитов селезенки активно изучается. Плазмоциты экспрессируют хемокиновый рецептор CXCR4 и реагируют на его лиганд CXCL12. В то же время, плазмоциты не экспрессируют CXCR5 и CCR7, и, следовательно, обнаруживают минимальную миграцию к CXCL13 и CCL21. Стромальные клетки в селезенке служат богатым источником CXCL12 и способны индуцировать миграцию В-клеток. И они поддерживают секрецию иммуноглобулинов плазмоцитами селезенки, главным образом продуцирующими IL-6. Примечательно, что селезеночные стромальные клетки экспрессируют большое количество CD54 – антигена вместе с CD11a. Благодаря стромальным клеткам плазмоциты привлекаются в красную пульпу и вносят вклад в их функционирование через комбинированную экспрессию CXCL12, CD54 и IL-6 [80].

Следует отметить, что красная пульпа селезенки является динамичным компартментом, интенсивно обменивающимся клетками с другими компартментами. Например, с маргинальной зоной, содержащей специализированные классы макрофагов и В-лимфоцитов. Разрушение инозитол-5-фосфатазы 1- молекулы негативного сигнала- приводит к потере В-клеток маргинальной зоны с транслокацией макрофагов из маргинальной зоны в красную пульпу. Поэтому макрофаги маргинальной зоны специфически необходимы для ретенции В-клеток маргинальной зоны. Если между ними нарушаются связи, то В-клетки мигрируют в фолликулы. Под действием *Staphylococcus aureus* В-клетки перемещаются в фолликулярную зону, а макрофаги маргинальной зоны - в красную пульпу [134].

Под влиянием мезенхимальной стромы селезенки, представленной ретикулярными клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса, связанного с этими клетками, во многом находятся перемещение рециркулирующих лимфоидных клеток и ток растворимых компонентов [39]. В эту направляющую функцию может также включаться адсорбция и селективное представление хоминговых цитокинов, продуцируемых региональными стромальными клетками. Фибробластические ретикулярные клетки образуют сеть, объединяющую различные части лимфоидной ткани селезенки, внося вклад в образование миграционного пути клеток и их месенджеров [177]. Захват иммунных комплексов ретикулярными клетками периваскулярных зон демонстрирует возможную роль этих клеток в оркестрировании специфического иммунного ответа [52]. Более того, добавление в культуре фибробластических клеток может привести к появлению плазмочитов в результате активации В-клеток, и выраженность этого активирующего эффекта зависит от происхождения клеток фибробластического ряда [52].

Несмотря на то, что многие молекулярные механизмы, имеющие отношение к миграционным процессам лимфоидных клеток, до конца не ясны, определенные моменты гистофизиологии фибробластических ретикулярных клеток получили подтверждение в исследованиях, проведенных в последние годы. Некоторые авторы указывают на их региональную неоднородность, связанную с наличием у них разных фенотипических маркеров. Но данные об их функциональной специфике и особенностях развития ограничены. В экспериментах по исследованию ретикулярной микроархитектоники селезенки фибробласты были идентифицированы моноклональными антителами ER-TR7, являющимися пан-фибробластическими маркерами, метящими фибробласты как красной, так и белой пульпы [56,157], однако установить региональные особенности ретикулярной сети этим авторам до конца не удалось. Поэтому любая

информация об архитектонике лимфоидно-мезенхимальных доменах селезенки представляется чрезвычайно важной.

В В-зонах содержится несколько меньше клеток фибробластического ряда, по сравнению с ПАЛВ, где они образуют густую сеть. Контроль за подобной компартиментализацией осуществляется геном LT β /LIGHT. В его отсутствие появляется диффузное распределение фибробластов, при сохраняющемся нормальном количестве лимфоидных клеток [67]. Поэтому, адекватное их распределение между Т- и В-зонами не только связано с соответствующим количеством лимфоцитов, но также зависит от индукционной способности лимфоцитов, которая нарушается в отсутствие LT β R. И что существенно, повреждения ретикулярного каркаса красной пульпы у иммунодефицитных мышей окрашиванием на ER-TR7 не получено. Это подтверждает тезис о том, что образование ретикулярных фибробластов в красной пульпе регулируется механизмами, отличными от таковых в белой пульпе и воздействующими на другие клетки [31,39].

Все вышеизложенное подчеркивает, что иммуноморфология селезенки - крупнейшего органа иммуногенеза - чрезвычайно сложна, что и определяет многофакторность иммунного ответа, реализуемого на уровне периферического звена иммунной системы [37, 102].

1.3. Особенности морфологии селезенки и ее компартиментов на разных этапах раннего постнатального онтогенеза. Онтогенетическая опосредованность изменений стромально - паренхиматозных взаимоотношений в селезенке.

Однозначных представлений о закладке и формировании органов иммунной системы в молодом возрасте до сих пор не существует, поскольку различные параметры иммунного ответа имеют разную возрастную динамику. Этим и обусловлен возрастающий интерес исследователей к морфологическим исследованиям иммунного статуса. Описывая клеточные популяции в различных компартаментах и зонах лимфоидных органов,

исследователи приближаются к пониманию процессов возрастных иммуномодуляционных изменений в организме в целом и на уровне каждого звена иммунной системы в частности.

Особенностями формирования органов иммунной системы в онтогенезе является ранняя закладка органов иммунной системы в эмбриогенезе. К моменту рождения основные органы иммуногенеза достигают достаточной для эффективного иммунного ответа зрелости.

Возрастным аспектам компартиментализации селезенки в литературе уделяется особое внимание. Ее развитие в раннем постнатальном онтогенезе сопровождается установлением связей между гемопоэтическими и стромальными клеточными популяциями многочисленных микроанатомических зон органа [36,44,47].

Как установил Боннет (Bonnet, 1912), и что в дальнейшем было подтверждено рядом исследований, селезенка имеет мезенхимальное происхождение и ее закладка происходит к концу первого месяца в задней стенке сальника, поблизости от большой кривизны желудка. Решающую роль в этом процессе играет капсулин, который вырабатывается в мезодермальных клетках. При его отсутствии орган не формируется. До двенадцатой недели идет интенсивное формирование стромы органа - капсулы и трабекул, а позднее — паренхимы, которая дифференцируется на белую и красную пульпу к седьмому месяцу внутриутробной жизни. На 10-28 неделе формируется стромальное микроокружение органа, которое стимулирует дифференцировку гемопоэтических клеток эритроидного и миелоидного ростков [36,15,44,46].

Первичные В - клеточные фолликулы формируются на 7 день после рождения практически одновременно с появлением фолликулярных CR1+ дендритных клеток. Миграция зрелых В - лимфоцитов из костного мозга в экстрафолликулярные пространства селезенки происходит несколько позднее. Зрелые В - лимфоциты локализуются в лимфоидных фолликулах и краевой зоне белой пульпы, там происходит их дифференцировка под воздействием

специфических антигенов [56,112]. По некоторым данным в селезенке генерируется пул В-1а клеток, по количеству не превышающих 1-2% от общего пула плазмочитов, но играющих важную роль в иммунитете против инкапсулированных бактерий, так как служат основным источником IgM [27]. У грызунов в возрасте до 10 дней Т-лимфоциты накапливаются периартериально, а В-лимфоциты располагаются диффузно по периферии белой пульпы. В 12 дневном возрасте ПАЛВ хорошо различимы, уже сформирована сеть фолликулярных дендритных клеток с CR1/2 рецепторами, которые относятся к первичным лимфоидным узелкам. В этот период они начинают увеличиваться в размерах, сети в них становятся гуще, с 42 дня начинают появляться герминативные центры [36,105].

Поскольку онтогенетические изменения в различных компартментах селезенки имеют неодинаковые тенденции, это свидетельствует о важной роли микроокружения в модуляции и регуляции клеточных популяций. Микроокружение индуцирует клеточный ре-шейпинг одновременно с прогрессированием клеточного мозаицизма в лимфоидной ткани [39]. Этот феномен поддерживается хроническими антигенными стимуляциями, которым иммунная система подвержена постоянно. Контакты с антигенами возникают сразу после рождения, и эта антигенная нагрузка приводит к самым ранним возрастным изменениям иммунной системы. У животных более старшего возраста такие изменения становятся более явными, что связано с «уменьшением иммунологического пространства», являющегося следствием «пожизненного антигенного стресса» [15].

Установлено, что у взрослых особей периферические CD4+Т-клетки более многочисленны, чем CD8+Т-клетки. На этапах раннего постнатального онтогенеза CD8+ Т клетки доминируют над CD4+ Т-клетками, и соотношение CD4:CD8 меньше единицы [173]. Высокое соотношение CD4:CD8 в лимфоидных органах взрослых определяется и контролируется тимусом [136]. Развитие способностей захвата иммунных комплексов связано с изменением зон в лимфоидных органах. Выявлено, что захват иммунных

комплексов начинается сразу после появления первичных фолликул в структуре селезенки [25].

Самый большой интерес представляют данные об изменениях компартментов селезенки на самых ранних этапах постнатального развития. Так выявлено, что в маргинальной зоне селезенки В-клетки обнаруживаются уже на 3-ий день после рождения [29]. Морфологически отчетливые маргинальные зоны в этот период еще не существуют. Большое количество В-клеток концентрически распределяется вокруг ПАЛВ. До обнаружения маргинальных зон ко второй неделе от рождения В-клетки компактно располагаются наружных отделах.

В-клетки в ранний перинатальный период имеют промежуточный размер и экспрессируют высокий уровень поверхностного IgM и HIS57-антигена, и низкий уровень поверхностного IgD и CD45R. Но в противовес В-клеткам взрослых животных, у крыс в неонатальном периоде В-лимфоциты маргинальной зоны экспрессируют более высокий уровень CD90. Экспрессия CD90 у В-клеток маргинальной зоны в раннем неонатальном периоде может иметь отношение к формированию иммунного ответа на липополисахарид (Т-независимый антиген II типа). Помимо этого, маргинальная зона селезенки содержит В-клетки, как экспрессирующие антиген B27, так и не экспрессирующие его [105] .

С возрастом в организме, в том числе и в селезенке, возрастает доля CD8+лимфоцитов памяти, которые имеют большое количество рецепторов к цитокинам Th1 и способны продуцировать неспецифический гамма-интерферон в ответ на действие цитокинов Th1. У мышей от 6 до 12 месяцев усиливается способность этих клеток осуществлять антиген-независимую продукцию гамма-интерферона. Фенотипические и функциональные возрастные изменения CD8+ Т-лимфоцитов, возможно, обусловлены появляющейся резистентностью к *Mycobacterium tuberculosis*. Поэтому во мере взросления образуется популяция CD8+ Т-лимфоцитов, вносящая вклад вклад во врожденный иммунный ответ на *M. Tuberculosis*. Это необходимо

учитывать при разработке мер по повышению иммунного ответа на *M. Tuberculosis* по мере взросления [136].

Имеются незначительные различия в содержании подтипов Т-клеток в крови и в селезенке. Количество Т-лимфоцитов в селезенке пропорционально массе тела животного, молодые животные имеют более низкое абсолютное число Т-клеток, что определяет их меньшие способности к адекватному иммунному ответу [84].

Роль селезенки плодного периода в гемопоэзе остается недостаточно изученной. В ее микроокружении гемопоэтические стволовые клетки теряют свою мультипотентность, не пролиферируют и дифференцируются в зрелые макрофаги. В селезенке плода получены стромальные клеточные линии, являющиеся уникальными в своей способности увеличивать пул миелоидных предшественников, результатом чего является появление большого количества зрелых макрофагов. Такие клеточные линии секретируют большое количество медиаторов, обладающих противовоспалительными свойствами [6].

Функционирование ПАЛВ связано с взаимодействиями между популяциями гемопоэтических и стромальных клеток, в том числе с ретикулярными фибробластами, которые образуют мезенхимальный каркас большинства тканевых компартментов. Изучено формирование разных доменов в белой пульпе селезенки мыши с участием ретикулярных фибробластов. Использование иммуногистохимического окрашивания белой пульпы на IBL-10 позволяет помечать ретикулярные клетки Т- и В-зон с разной интенсивностью. IBL-10 (высок)+ клетки обнаруживаются главным образом между периферической частью ПАЛВ и лимфоидных узелков, а IBL-10(низк)+ клетки в основном диффузно располагаются по всей белой пульпе. IBL-10(высок.)+ клетки обнаруживаются на второй неделе с момента рождения и отсутствуют у мышей с выраженным иммунодефицитом. Клетки фибробластического ряда идентифицировали с помощью антитела IBL-11, эти клетки по-другому располагались в ткани ПАЛВ - нешироким поясом на

границе между фолликулами и маргинальной зоной. IBL-11+ ретикулярные клетки появляются позже, чем IBL-10(низк)+ клетками. Они образуются независимо от влияния лимфоцитов, имеющих рецепторы к антигенам, что можно было бы предполагать, исходя из наличия IBL-11+ фибробластов у мышей с иммунодефицитом SCID. При введении мышам разных популяций лимфоцитов SCID получали частичную компартиментализацию белой пульпы фибробластами, что демонстрирует возможность мезенхимальных предшественников фибробластов сохранять способности к дифференцировке при контактах со зрелыми Т- или В-клетками [56,137].

Фоликулярные дендритные клетки выявляются при окрашивании с использованием маркеров фолликулярных дендритных клеток – рецепторов к комплементу. Эти клетки могут быть обнаружены у крыс с 6-дневного возраста в Пейровых бляшках и лимфатических узлах, селезенке – у 14-дневных крыс, в брыжеечных и подколенных лимфатических узлах также с 2-х недельного возраста [170].

Некоторые авторы полагают, что появление фолликулярных дендритных клеток совпадает с первым появлением лимфоидных узелков. Они являются главным компонентом микроокружения лимфоидных узелков и обладают способностью к захвату иммунных комплексов и удержанию их достаточно длительное время – это обусловлено имеющимися у них рецепторами к Fc и комплементу. У фолликулярных дендритных клеток эта способность появляется в более ранние сроки. ФДК всегда лоцируются рядом с лимфоидными скоплениями. Это значит, что они способны к экспрессии своих рецепторов на ранних стадиях дифференцировки фолликулярных дендритных клеток из их предшественников только после того как начнут взаимодействовать с узелковыми скоплениями В-лимфоцитов, присутствующими в ранних лимфоидных фолликулах. По некоторым другим данным время появления лимфоидных узелков и фолликулярных дендритных клеток у крыс совпадает [151].

Центры размножения – важнейшая морфологическая структура регуляции иммунного ответа при аутоиммунных процессах. Показана возможность образования герминативных центров в селезенке крыс со спонтанно развившимся аутоиммунным диабетом I типа и волчаночноподобным заболеванием. У крыс, у которых не было развития волчаночноподобного заболевания, спонтанного формирования центров размножения не выявлялось. В каждом случае центры размножения выявлялись в возрасте 1-2 месяцев, то есть в период, соответствующий появлению аутоантител. Так же, как и герминативные центры, которые образуются после их принудительной иммунизации. Центры размножения аутоиммунных особей включали B220(+), PNA(+), и GL-7(+) B-клетки и FDC-M1(+) фолликулярные дендритные клетки. Те центры размножения, которые спонтанно формировались во время аутоиммунного ответа и те, которые возникали после принудительной иммунизации, одновременно расформировывались после введения антител к CD40-лиганду. Эти исследования доказывают, что спонтанно образующиеся антитела при аутоиммунных процессах аналогичны тем, что появляются при иммунизации [122, 135].

Ответ герминативных центров на антигенное воздействие это типичная черта T-зависимого гуморального иммунного ответа. Они необходимы для формирования В-клеток памяти и представляют собой сайт гипермутации V-региона гена Ig. После нескольких суток с момента захвата антигена происходит перемещение антиген-специфических T- и В-клеток к зонам лимфоидных фолликулов с большим количеством фолликулярных дендритных клеток для начала формирования герминативных центров. В герминативном центре происходит быстрая пролиферация В-клеток с изменением их изотипа, соматическими мутациями, а также селекция на высокую аффинность к антигену, который участвует в иммунном процессе [104].

Герминативные центры путем апоптоза освобождаются от В-клеток, приобретших реактивность к тем антигенам, которые не присутствуют на фолликулярных дендритных клетках. Таким образом, антиген-стимулированная активация В-лимфоцитов герминативных центров приводит к их гибели при отсутствии прямых стимулов от фолликулярных дендритных клеток и/или CD4⁺ клеток, находящихся вблизи герминативных центров. Такие стимулы медируются CD40L, которые присутствуют на Т-хелперах с C3d-соединенным антигеном, который был захвачен фолликулярными дендритными клетками [11]. Поэтому, мутации V(D)J не расширяют специфичности В-клеток центров размножения, поскольку они не распознаны Т-клетками центров размножения и не находятся в кровотоке в свободной циркуляции. Благодаря этому не развивается аутореактивность.

Показано, что у некоторых грызунов с возрастом уменьшается число и размеры герминативных центров и по достижении возраста шести месяцев они уже не определяются. По-видимому, утрата центров размножения с возрастом имеет отношение к нарушению морфологии селезенки, связанной с массивным накоплением двойных негативных Т-клеток в селезенке мышей этих линий. Этот тезис доказывается исследованиями, в которых при хроническом введении антител против CD8 происходило интенсивное образование новых центров размножения и уменьшение количества Т-клеток в селезенке [11, 36,105].

Примерно через 7 дней после попадания в селезенку CD4⁺CD90⁺клетки превращаются в наивные Т-клетки (CD45RC⁺). Клетки памяти являются наиболее зрелыми клетками среди Т-лимфоцитов, но не самыми долгоживущими. По мере старения организма их доля возрастает до 25% за счет недавних тимусных иммигрантов, количество наивных клеток при этом не изменяется [170]. Таким образом, заселение селезенки Т-лимфоцитами определенной зрелости связано с возрастом тимуса и его функционального состояния.

Эти клетки отличаются экспрессией поверхностных молекул, но способы их миграции в периферических иммунных органах похожи. В лимфоидной ткани все три подкласса клеток увеличивают экспрессию CD44 и ICAM-1 и ослабляют экспрессию L-селектина. Такие механизмы увеличивают время, необходимое для миграционных процессов по тканям и уменьшают его при рециркуляции [156].

У неонатальных крыс большинством Т-клеток являются Thy1⁺ и RT6⁻, в то время как их предшественники Thy1⁻ RT6⁺ клетки. Таким образом, недавние тимусные иммигранты у нормальных крыс в большинстве являются фенотипически и функционально незрелыми к моменту их перемещения из тимуса, но постепенно приобретают в селезенке черты более зрелых клеток [115].

При иммуногистохимическом окрашивании селезенки на каспазу-3 у животных разного возраста – 6-ти дней, 2-х месяцев, 3-х и 5-ти месяцев - выявилось, что особенности распределения иммунопозитивных клеток имеются только у крыс 6-дневного возраста: установлено диффузное преобладание позитивных клеток в селезенке [134].

В постнатальном периоде в селезенке описаны выявляемые иммуногистохимически изменения популяций Т-лимфоцитов. В процессе онтогенеза существенно возрастает доля гамма-дельта Т-лимфоцитов в селезенке и крови. Постнатальное развитие характеризуется увеличением доли CD8⁺CD3⁺CD4⁻гамма-дельта-ТКР-клеток, эти изменения компенсируются уменьшением доли CD4⁺ клеток.

На первом месяце жизни не часто встречаются двойные позитивные CD4⁺CD8⁺ лимфоциты, по мере взросления их доля значительно увеличивается во всех компартментах. CD4⁺ Т лимфоциты состоят из двух субпопуляций Th-клеток: Th1 и Th2. Th1-клетки продуцируют гамма-интерферон и участвуют в реакции клеточного иммунитета против внутриклеточных патогенов. Th2-клетки продуцируют IL-4, IL-5, и IL-13 и обеспечивают реакцию на аллерген и гуморальный иммунный ответ.

Дифференциация наивных CD4⁺ Т клеток в Th1-клетки происходит после распознавания антигена с участием IL-12, а присутствие IL-4 запускает их дифференцировку в Th2-клетки. В дополнение к этим медиаторам, стимуляция Т-клеточных рецепторов антигенами также необходима для дифференцировки как в Th1, так и в Th2-клетки. Выявлено, что для дифференцировки Th2-клеток обязательна эффективная ТКР-медиаторная активация p56lck, кальциневрина и сигнализирующего каскада Ras-ERK MAPK [31,114,136,154].

За контакт стромальных клеток и лимфоцитов в селезенке, не зависящий от экспрессии хемокинов, ответственен ген Nkx2-3. При отсутствии этого гена из-за недостаточного развития белой пульпы формируется гипоплазия селезенки или даже аспления. Фолликулярные дендритные клетки, которые не экспрессируют FDC-M2 фактор не вступают во взаимодействие с В-клетками даже при адекватной экспрессии хемокинов. Дезорганизация селезенки в отсутствие В-клеток маргинальной зоны имеет не гемопозитическое, а стромальное происхождение. [27, 102, 127].

Таким образом, эмбриональный период развития иммунной системы, и селезенки в частности, характеризуется формированием и созреванием основных звеньев неспецифического и адаптивного иммунитета. Однако иммунная система плода, ее системные и локальные механизмы к моменту рождения являются недостаточно эффективными, незрелыми и не имеющими опыта организации многоуровневой защиты против опасных патогенов и других факторов агрессии окружающей среды. Помимо этого, иммунная система новорожденного находится в состоянии непрерывного созревания, дифференцировки и совершенствования ее функций и формирования специфической иммунологической памяти [162].

Иммуногистохимические исследования селезенки на всех этапах постнатального онтогенеза демонстрируют наличие проблем в понимании тонких механизмов развития иммунной системы, что является стимулом

продолжения исследований гистофизиологии и иммуноморфологии селезенки растущего организма.

1.4. Изменения стромальных и паренхиматозных элементов красной и белой пульпы. Адаптационные перестройки в селезенке при хроническом действии различных по характеру стрессоров в различные периоды постнатального онтогенеза

Ганс Селье в 1972 году определил стресс как «неспецифический ответ организма на любое требование, предъявленное ему» [H.Selye, 1972]. Позже такое определение стресса было модифицировано G.P.Chrousos, понятие «неспецифический» было заменено гипотезой о том, что любой стрессор, который действует с интенсивностью, выше пороговой, будет вызывать «стресс-синдром». До сих пор этот термин используют для обозначения широкого круга состояний, которые возникают в ответ на различные экстремальные воздействия. Реакция организма на стресс является одной из важнейших регуляторных функций, которая реализуется иммунной системой посредством выделения, накопления, связывания биологически активных веществ, что обеспечивает сохранение гомеостаза. Органы иммунной системы принимают непосредственное и решающее участие в механизмах стресса [13,40,123,156].

Селезенка - полифункциональный орган, играющий весьма важную роль в процессах гомеостаза, особенно в критических ситуациях, когда для биосистемам требуются не только поставки компонентов для защитных реакций, но и их восполнение и, прежде всего, регуляция этих процессов на уровне всего организма.

Различают несколько видов стресса: физический и психологический, острый и хронический. Вероятно, что различные виды стресса оказывают неодинаковое влияние на выработку гормонов стресса и соответственно на иммунную систему [20,76,112].

Во многих работах сравнивается воздействие острого и хронического стресса на иммунную систему. Считается, что острый стресс может положительно влиять на функции иммунного ответа (функции макрофагов, нейтрофилов, NK-клеток). Хронический же стресс, напротив, может неоднозначно воздействовать на отдельные иммунокомпетентные клетки, например, активирующее на NK-клетки и тормозящее – на нейтрофилы. Помимо этого продемонстрировано, что острый стресс, несмотря на увеличение количества NK-клеток, уменьшает их цитотоксичность [14,77,123].

Ряд исследователей доказывают, что острый стресс является иммуностимулирующим, а хронический стресс подавляет иммунный ответ [76], при этом некоторые авторы демонстрируют угнетение активности иммунного ответа при воздействии острого стресса [58,69,135] или, наоборот, отмечают активизацию иммунных функций при повторных действиях стрессоров [89,140].

Большое количество противоречий, встречающихся в современной литературе по нейроиммуноэндокринологии стресса, касается не только механизмов и диапазона адаптационных перестроек в органах иммунитета, но и направленности постстрессовых иммуномодуляционных изменений в них. Такая ситуация может быть объяснена тем, что большая часть таких исследований не учитывала факта компартиментализации лимфоидных органов, и селезенки в частности, взаимного влияния структур в центральном и периферическом звене иммунной системы. Стоит подчеркнуть, что наименее изученным является воздействие стресса на иммунный статус организма на ранних стадиях постнатального онтогенеза в условиях функциональной незрелости органов иммунной защиты.

На протяжении последних лет исследователи использовали многочисленные модели стресса [20,51,55,76,112,156]. Установлено, что лимфодегенеративное, лимфодеструктивное и лимфопролиферативное действие стресса способно привести к продолжительному нарушению

иммунного ответа. Было неоднократно продемонстрировано, что по мере старения организма механизмы постстрессовой иммуномодуляции претерпевают определенные изменения [47,99,108]. Однако до сих пор нет полного представления о механизмах влияния стресса на клетки различных субкомпартов селезенки, что связано с недостаточным количеством исследований микроархитектоники селезенки, особенно в раннем возрасте, и это приводит к затруднению в понимании закономерностей становления иммунных реакций в раннем постнатальном онтогенезе.

1.4.1. Стрессассоциированная иммуномодуляция с учетом паттерна активации гипоталамо – гипофизарно - адренокортикальной оси. Нейроиммуноэндокринные последствия и изменения иммуноморфологии селезенки при воздействии различных моделей стресса

Для оценки эффективности взаимодействия основных регуляторных систем для сохранения гомеостаза применяют различные модели стресса, при которых повышается активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и симпато-адреналовой системы.

Деятельность селезенки находится под контролем нервной и эндокринной систем. Центральный контроль функции селезенки связан с гипоталамо-гипофизарной системой. При удалении гипофиза происходит гипоплазия селезенки и снижение регенеративных процессов [2,24,59,78,119]

Активация ГГАО является одним из важнейших механизмов, с помощью которого мозг контролирует иммунную систему. Физическая стимуляция способствует выработке цитокинов, психологическая стимуляция запускает выделение из паравентрикулярного ядра гипоталамуса кортикотропин -рилизинг-фактора, что служит сигналом к секреции АКТГ в системный кровоток. АКТГ стимулирует синтез и секрецию глюкокортикостероидов надпочечниками. У человека основным глюкокортикостероидом является кортизол, а у грызунов - кортикостерон.

Физиологические уровни глюкокортикостероидов считаются иммуномодулирующими, а постстрессовые уровни являются иммуносупрессивными [2,86,136].

Существуют множество классификаций стресса и различные подходы к категоризации разных видов стрессоров. Так ГГНО «распознает» стрессоры, различающиеся по продолжительности и интенсивности. При этом имеются различия в паттернах активации и восстановления после стрессового воздействия. Иммунная система реагирует на воздействие острого и хронического стресса иммуномодуляционными сдвигами принципиально различными по направленности и характеру. При этом в работах различных авторов имеются семантические различия в понимании хронического стресса. Некоторые авторы полагают, что хронический стресс должен иметь по меньшей мере 7-кратную повторяемость, другие исследователи считают, что хроническим стрессом считается лишь после 2-недельного повторяющегося воздействия стрессора, третьи доказывают, что уже двух 12-ти часовых сеансов иммобилизации достаточно для того, чтобы считать стресс хроническим по характеру вызванных им иммуносупрессивных изменений [20,76,169,170].

Диапазон и направление иммуномодулирующего воздействия стресса зависят также от количества и качества интервенций и антигенных стимуляций, временных соотношений между поведенческими и антигенными интервенциями, характером иммунного ответа и компартментом иммунной системы, в котором он оценивается, временем взятия материала для оценки и различием характеристик субъекта стресса: вида животного, возраста, пола и т.д.

И острый и хронический стресс модулируют лимфоцитарный иммунный ответ. Сравнительное исследование эффектов острого и хронического стресса на иммунную систему продемонстрировало, что острый стресс инициирует уменьшение размеров лимфоидных узелков и появление клеточного детрита в центрах размножения, а хронический стресс способствует гипоплазии белой

пульпы: уже через 7 дней ее площадь уменьшается на четверть, а кроме того снижается количество митозов и бластных клеток в центрах размножения и изменяются размеры лимфоидных узелков. Через 14 дней наблюдается некоторое увеличение размеров лимфоидных узелков, исчезновение детрита, частичное восстановление клеточности. Полное восстановление морфологической картины возможно не ранее, чем через 30 дней после воздействия стресса. [21,24,35,148].

Стрессор умеренной силы, действующий остро, способен увеличить иммунный ответ, хронический же стресс угнетает иммунную функцию и делает организм чувствительным к инфекционным агентам. Особенный интерес вызывает выявленная при стрессе связь эндогенных опиоидов с рецепторами клеточной смерти CD95. После связи CD95+ с антителом наступает активизация каспазных систем, что приводит к гибели клеток апоптозом. Чтобы понять биохимические механизмы, посредством которых взаимодействуют иммунная и нервная системы, необходимо идентифицировать специфические опиоидные пептиды и типы рецепторов к опиоидам [12,60,135].

Важнейшей экспериментальной моделью является иммобилизационный стресс. По своей природе он чаще всего является психологическим стрессором и стимулирует образование различных иммуносуппрессивных медиаторов [24]. Регуляция иммунного ответа кортикостероидами осуществляется в результате их способности специфически связываться с их рецепторами. Эти рецепторы экспрессируются всеми видами лейкоцитов. Глюкокортикостероиды приводят к усилению иммунного ответа после воздействия острого стресса и торможению при воздействии хронического стресса [67,76,156].

Иммобилизационный стресс значительно изменяет чувствительность лимфоцитов к кортикостерону, но поскольку при иммобилизационном стрессе секреция кортикостерона повышается, она оказывает влияние лишь на реакции гиперчувствительности замедленного типа. При остром и при

хроническом стрессе наоборот имеет место повышение концентрации эндогенных опиоидных пептидов, и это имеет важнейшее значение в изменениях в иммунной системе, индуцированных стрессом [60,12].

Хронический иммобилизационный стресс оказывает выраженное воздействие на иммунный ответ. В эксперименте у крыс он вызывает перераспределение иммунных клеток между периферическими органами иммуногенеза и их компартментами. Наиболее выражено заметно воздействие стрессоров на количество разных подтипов Т-клеток во всех органах иммуногенеза, которые подверглись анализу, и прежде всего, в селезенке [24].

При гравитационном стрессе у крыс отмечено появление в селезенке значительного числа макрофагов с неокрашенной цитоплазмой с апоптозными тельцами, что подтверждается иммуногистохимическими методами. Спустя 9 дней после полета картина нормализуется [143]. Такие результаты говорят о возможности суждения об уровне апоптоза по числу макрофагов с апоптозными тельцами в цитоплазме, а их повышенное количество после стрессового воздействия позволяет распознать важнейший механизм снижения клеточности в селезенке при стрессе. Таким маркером является повышенное количество иммунных клеток, подвергшихся апоптозу.

НК-клетки и макрофаги, с активностью которых связаны немедленные неспецифические клеточные иммунные реакции, также подвержены влиянию острого и хронического стресса. Стрессовое воздействие уменьшает число НК-клеток и способность моноцитов презентировать антиген, что вероятно обусловлено изменением уровня кортикостероидов. В других исследованиях продемонстрировано увеличение числа НК-клеток с одновременным снижением их активности. В противовес этим данным, существуют работы показавшие, что число НК-клеток после воздействия острого иммобилизационного стресса не изменяется, несмотря на их повышенную чувствительность к воздействию стресса [14,123,156].

Показано, что при хроническом стрессе в селезенке выявляется уменьшение числа клеток больше, чем на треть за счет CD4+, CD8+ и

CD19+клеток. С применением INSEL-метода продемонстрировано, что с CD95- апоптозом связано значительное уменьшение клеточности селезенки. CD95 это трансмембранный белок, относящийся к рецепторам FNO, его экспрессия обусловлена несколькими видами клеток, включая лимфоциты и гепатоциты. В процессе взаимодействия FNO со специфическими агонистическими антителами и лигандом CD95L происходит активизация каспаз, что способствует гибели путем апоптоза нескольких клеточных линий. Гибель путем апоптоза периферических Т-лимфоцитов, медиированного через взаимодействие Fas - Fas-лиганд, не позволяет развиваться аутоиммунным реакциям. Поэтому система CD95–CD95-лиганд выполняет интегральную функцию в поддержании клеточного гомеостаза в иммунной системе и может способствовать ее повреждению при хроническом стрессе [122,143].

Эффективное регулирование гибели путем апоптоза лимфоидных клеток важно для нормального функционирования иммунной системы. Если функционирование этой системы нарушено возникает дисбаланс и дисфункция иммунной системы, что может привести к появлению новообразований лимфоидной ткани. Возможность лимфоцитов гибнуть путем апоптоза связана с активностью генов, которые эволюционно экспрессируются. Этому же способствуют сигнальные взаимодействия, которые возникают путем мессенджерных контактов лимфоцитов и вспомогательных клеток в компартаментах селезенки. Таким важным компартаментами являются герминативные центры в которых проходит селекция популяций лимфоцитов с высоко аффинными В-клеточными рецепторами. В-лимфоциты с низкоаффинными В-клеточными рецепторами - гибнут путем апоптоза. Повреждения клеток центров размножения, появившиеся в результате воздействия стресса могут потенцировать долгосрочные сдвиги в иммунной системе [96,102].

В-лимфоциты приобретают увеличивающуюся резистентность к апоптозу во время своей дифференцировки в микроокружении герминативных

центров лимфоидных фолликулов. Это происходит благодаря увеличению уровня белка Bcl-2, а также обусловлено сигналами к выживанию, которые генерируются при связывании В-лимфоцитов с ФДК. Однако, до сих пор до конца не ясно, может ли эта клеточная резистентность к апоптозу быть преодолена в результате воздействия множественных стрессорных факторов, приводящих к индукции избыточного апоптоза В-клеток [143].

При ингибировании дифференцировки дендритных клеток человека дексаметазоном определяется снижение экспрессии антиген-презентирующих молекул, костимулирующих и адгезионных молекул и маркеров зрелых дендритных клеток. Дексаметазон, в отличие от Т- и В-клеток, не вызывает апоптоза дендритных клеток, несмотря на то, что он уменьшает активность ядерного фактора NF-каппа В. Дендритные клетки после воздействия дексаметазона теряли способность к стимуляции пролиферации Т-клеток в соответствии с уровнем CD14+CD83- клеток. Без введения дексаметазона CD83+ клетки не теряли способность синтезировать ИЛ2 и способность стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток.

Таким образом, основное действие дексаметазона – изменение способности к дифференцировке дендритных клеток, при сохраняющейся активности цитокинов (TNF-альфа, ИЛ-1, бета простагландин Е2), которые дополнительно вводились в среду. Если действие дексаметазона оказывается сильнее дифференцировочных сигналов среды с провоспалительными медиаторами, то дифференцировка дендритных клеток идет по моноцитарно-макрофагальному пути. Ингибирование дифференцировки дендритных клеток может вносить вклад в иммуносупрессию, связанную с хроническим введением кортикостероидов [83,112].

Глюкокортикоиды воздействуют на приобретенный иммунный ответ, подавляя клеточный иммунный ответ (воздействием на Th1) и обеспечивая гуморальный иммунный ответ (воздействием на Th2). К тому же они могут изменять толерантность к антигенам, действуя на процессы созревания и функции дендритных клеток [50,114,125,168].

Суммируя результаты исследований о влиянии стресса на иммунную систему, можно констатировать что несмотря на большое количество работ по иммуномоделирующему воздействию стресса, многие аспекты этой проблемы остаются недостаточно изученными, противоречивыми и даже взаимоисключающими: это касается, прежде всего, возрастных аспектов стресс-ассоциированной иммуномодуляции.

Установлена также противоречивость представлений относительно тонких процессов функционирования паренхиматозных и стромальных клеточных элементов в процессе онтогенеза при воздействии иммуномоделирующих факторов, включая стресс, а также ГГНО-зависимых и - независимых путях иммуномодуляционных сдвигов на уровне периферического звена иммунной системы, прежде всего селезенки, как крупнейшего и наиболее компартментализованного ее органа. Недостаточно изучено влияние различных видов стресса и ответ на эти стрессоры организма в самом раннем постнатальном онтогенезе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 48 крысах породы Спрег-Дуули в возрасте 20 и 45 суток, что соответствовало инфантильному и перипубертатному периодам постнатального развития. На момент окончания эксперимента возраст был 28 и 53 суток соответственно. В каждой возрастной группе, включающей 24 особи, животных подразделяли на 3 подгруппы: контрольную и 2 экспериментальные для моделирования 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 °С. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре +20°С с доступом к воде и пище *ad libitum*. Экспериментальных животных ежедневно на протяжении 9 суток 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 PC 10) - ядерного антигена пролиферирующих клеток (AbDSerotec, США, MCA 1558); 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, AHP476), OX62 (клон MRC OX62) - маркеру дендритных клеток (AbDSerotec, США, MCA

1029); CD20 (клон R1N- 9D3) - маркеру пре- и зрелых В-лимфоцитов (AbDSerotec, MCA 1432).

Для визуализации применяли стрептавидин-биогин - 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, среднеквадратическое отклонение, ошибку репрезентативности. Оценку значимости различий сравниваемых величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости считали $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Морфометрический анализ селезенки крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза при воздействии гомо- и гетеротипического стресса

С четвертой недели жизни у крыс отмечается динамичное развитие иммунной системы, и прежде всего, селезенки. Изучение нами гистологического строения селезенки животных контрольной группы с исходным возрастом 20 суток показало, что в селезенке крыс этого возрастного периода наблюдалось преобладание белой пульпы, что характеризовалось расширением ПАЛВ, увеличением размеров лимфоидных узелков и герминативных центров в лимфоидных узелках. Отмечалось умеренное количество клеток с фенотипом недавних тимусных иммигрантов CD90+: они по большей части были локализованы в наружной зоне ПАЛВ, частично – в маргинальной зоне и в красной пульпе. Определялось небольшое число CD8+ клеток, главным образом в ПАЛВ. Большинство CD8+ клеток располагалось в периартериальных лимфоидных влагиалищах, их концентрация была несколько выше у контрольных животных перипубертатного возраста; незначительное количество CD8+ клеток было локализовано в красной пульпе, практически единичные клетки - в маргинальной зоне.

Хронический стресс при действии как гомо-, так и гетеротипических стрессоров вызывал выраженные изменения в селезенке. Они заключались в изменении объема Т- и В-зон белой пульпы, маргинальной зоны, расположения клеток как в Т-зонах (периартериальных лимфоидных влагиалищах), так и в В-зонах (лимфоидных узелках). Полученные данные морфометрического анализа отражены в рис 1.

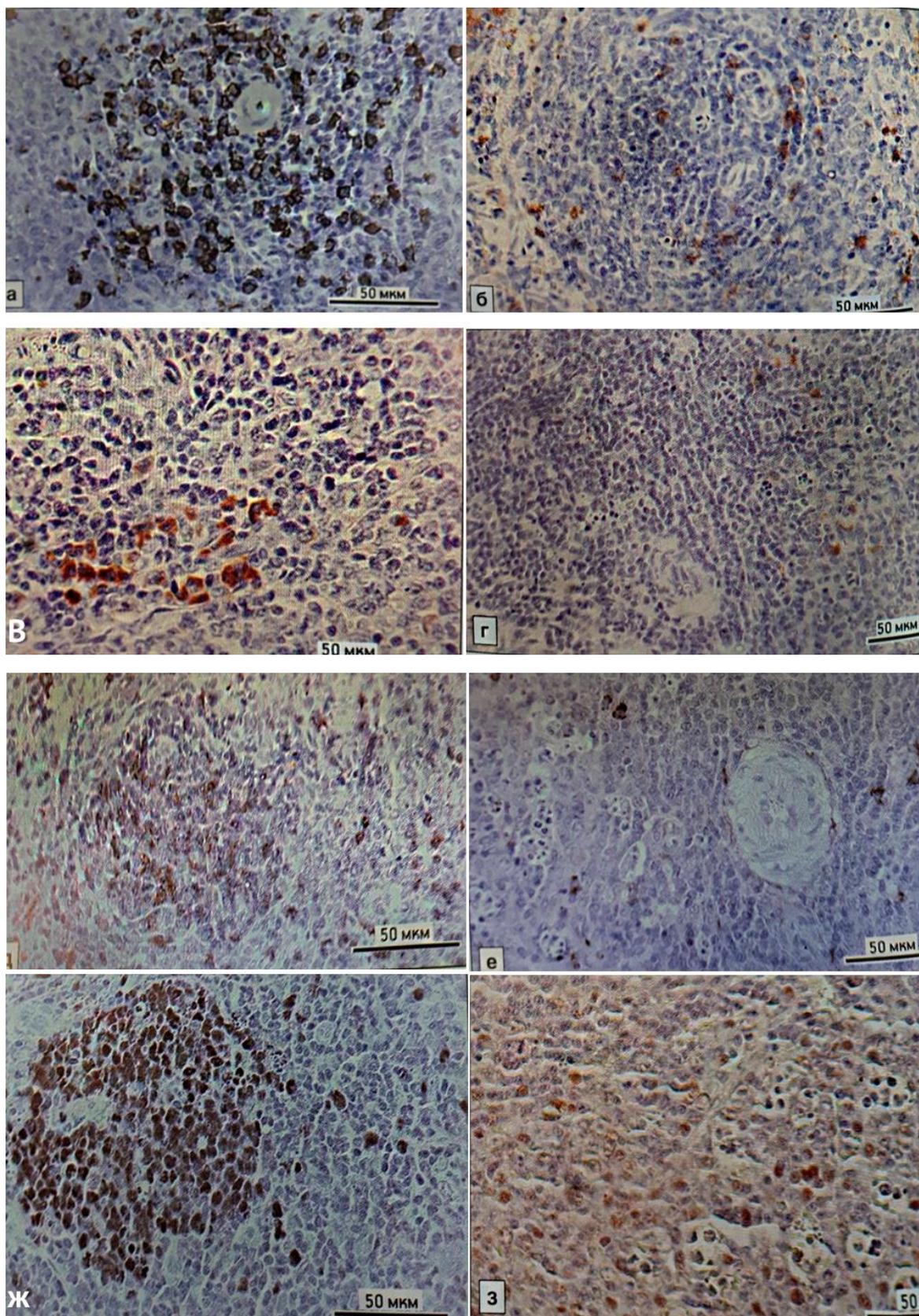


Рисунок 1. Изменения микроморфологической картины селезенки контрольных и экспериментальных животных после воздействия гомотипического и гетеротипического стресса.

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 OX62+, ж, з - реакция на PCNA

Сразу после окончания стрессорного воздействия наблюдалось резкое уменьшение клеточности в белой пульпе селезенки, уменьшение объема Т-зон (периартериальных лимфоидных влагалищ селезенки), редукция В-зон, активация процесса апоптоза, которая проявлялась повышением количества макрофагов с неокрашенной цитоплазмой, захвативших апоптозные тельца, которые накапливались как в В-зонах, так и в Т-зонах. Эти изменения были более выражены в Т-зонах животных инфантильного возраста и В-зонах крыс перипубертатного возраста.

В селезенке контрольных животных CD8+клетки располагались равномерно, с концентрацией в периартериальных лимфоидных влагалищах, плотность CD8+клеток была несколько выше у животных перипубертатного возраста; меньшее число этих клеток накапливалось в красной пульпе, незначительное количество - в маргинальной зоне, в лимфоидных узелках они отсутствовали. После стресса их доля в периартериальных лимфоидных влагалищах резко уменьшилась и у контрольных и у экспериментальных животных всех возрастных групп. Этому соответствовало общее уменьшение объема Т-зоны селезенки.

Уменьшение количества CD8+ клеток в маргинальной зоне и ПАЛВ зависело от характера и выраженности стрессорного воздействия: при гетеротипическом стрессе совсем незначительное количество иммунореактивных клеток определялось во внутренней зоне ПАЛВ, при гомотипическом стрессе иммунореактивные клетки обнаруживались в наружной зоне ПАЛВ и в маргинальной зоне.

CD90-позитивные клетки определялись сконцентрированными в основном в Т-зонах, единичные клетки встречались в селезеночных тяжах. После воздействия стресса они практически исчезли из белой пульпы, особенно у животных инфантильной группы. Число CD90+клеток снижалось в зависимости от вида стресса: при гомотипическом стрессе в наружной зоне преимущественно крупных ПАЛВ присутствовало небольшое число клеток, а

при гетеротипическом стрессе у крыс инфантильного возраста в ПАЛВ и селезеночных тяжах персистировали единичные клетки.

При окрашивании на CD20 отмечалось яркое окрашивание и высокая плотность клеток в лимфоидных узелках и по убывающей в маргинальной зоне и красной пульпе селезенки. Стресс вызвал опустошение лимфоидных узелков селезенки из-за резкого снижения в них числа иммунореактивных клеток; в меньшей степени это касалось маргинальной зоны и селезеночных тяжей у животных обеих возрастных подгрупп.

Окрашивание на белок S100 показало, что после стрессорного воздействия сеть стромальных клеток лимфоидных узелков селезенки, оказалась практически полностью разрушенной, особенно выраженными эти изменения были при воздействии гетеротипического стресса. Отличием являлось то, что у животных исходного перипубертатного возраста в целом лимфоидных узелков было больше, они отличались большими размерами в большинстве из них определялись вторичные лимфоидные узелки, в сравнении с животными исходного инфантильного возраста у которых первичные лимфоидные узелки были мельче, и малочисленнее, а вторичные лимфоидные узелки практически отсутствовали.

Каспаза-3-иммунореактивные клетки содержались в селезенке – больше в белой пульпе, чем в красной пульпе, причем больше в В-зонах, чем в Т-компартаментах, и увеличение их доли было заметно выше при гетеротипическом стрессе у животных перипубертатной экспериментальной группы.

При окраске на PCNA площадь иммунореактивных клеток в ПАЛВ снижалась умеренно в инфантильной группе и резко – у животных перипубертатного возраста. Снижение количества иммунореактивных клеток в лимфоидных узелках сопровождалось их разрушением и практически полным исчезновением.

3.2. Имидж анализ селезенки крыс разных возрастных групп при воздействии гомо- и гетеротипического стресса

Для объективизации наблюдений был проведен цифровой анализ изменений в селезенке, позволивший выявить наиболее информативные критерии оценки постстрессовой динамики различных клеточных популяций. Результаты морфометрии получены при обработке срезов селезенки, где значительная площадь среза позволяла с помощью заданного шага произвольно выделять требуемых 5 полей зрения для имидж-анализа.

Удельная площадь CD4+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного возраста составила $16.25 \pm 1.47\%$, перипубертатного возраста - $18.34 \pm 1.62\%$. В экспериментальной группе после воздействия гомотипического стресса удельная площадь CD4+иммунореактивных клеток у крыс инфантильного возраста составила $11.09 \pm 1.18\%$, что достоверно отличалось от показателей контрольных крыс соответствующего возраста ($p < 0,01$). У животных перипубертатного возраста динамика была менее выражена, но также статистически значима, содержание CD4+иммунореактивных клеток снизилось до $13.09 \pm 1.44\%$ ($p < 0,05$).

После воздействия гетеротипического стрессора изменения исследуемых параметров по сравнению с контрольной группой оказались еще более выраженными, особенно у экспериментальных крыс инфантильного возраста. Установлено значительное уменьшение удельной площади CD4+иммунореактивных клеток у крыс обеих возрастных групп, которая составила $9.76 \pm 1.14\%$ и $11.91 \pm 1.21\%$ соответственно ($p < 0,01$) (рис. 2)

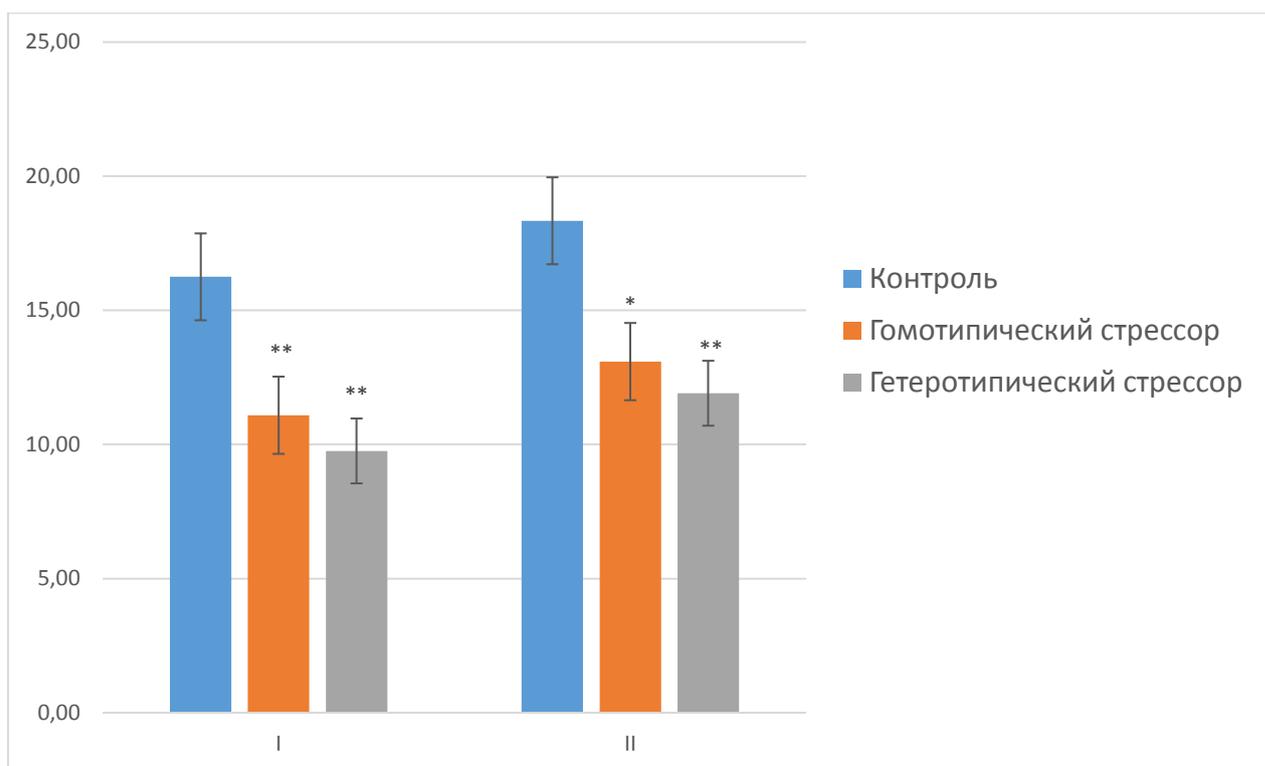


Рисунок 2. Удельная площадь CD4+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

По горизонтальной оси: I – инфантильный возраст; II – перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$; Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

Изучение воздействия гомо - и гетеротипических стрессоров на CD8+иммунореактивные клетки в селезенке контрольных и экспериментальных крыс продемонстрировало похожие тенденции. Удельная площадь CD8+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного и перипубертатного возраста составила $19.98 \pm 1.67\%$ и $19.98 \pm 1.67\%$ соответственно. Воздействие гомотипического стресса привело к достоверному снижению удельной площади CD8+иммунореактивных клеток до $14.05 \pm 1.39\%$ у крыс инфантильного возраста ($p < 0,01$). У крыс перипубертатного возраста уменьшение доли CD8+ лимфоцитов на фоне гомотипического стресса было менее отчетливым, но достигло степени статистической достоверности и составило $17.13 \pm 1.87\%$ ($p < 0,01$). Под действием гетеротипического стресса произошло снижение удельной площади CD8+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс и

инфантильного, и перипубертатного возраста высокой степени достоверности, доля CD8⁺ лимфоцитов в этой подгруппе составила $12.53 \pm 1.32\%$ и $14.35 \pm 1.41\%$ соответственно ($p < 0,01$) (рис. 3).

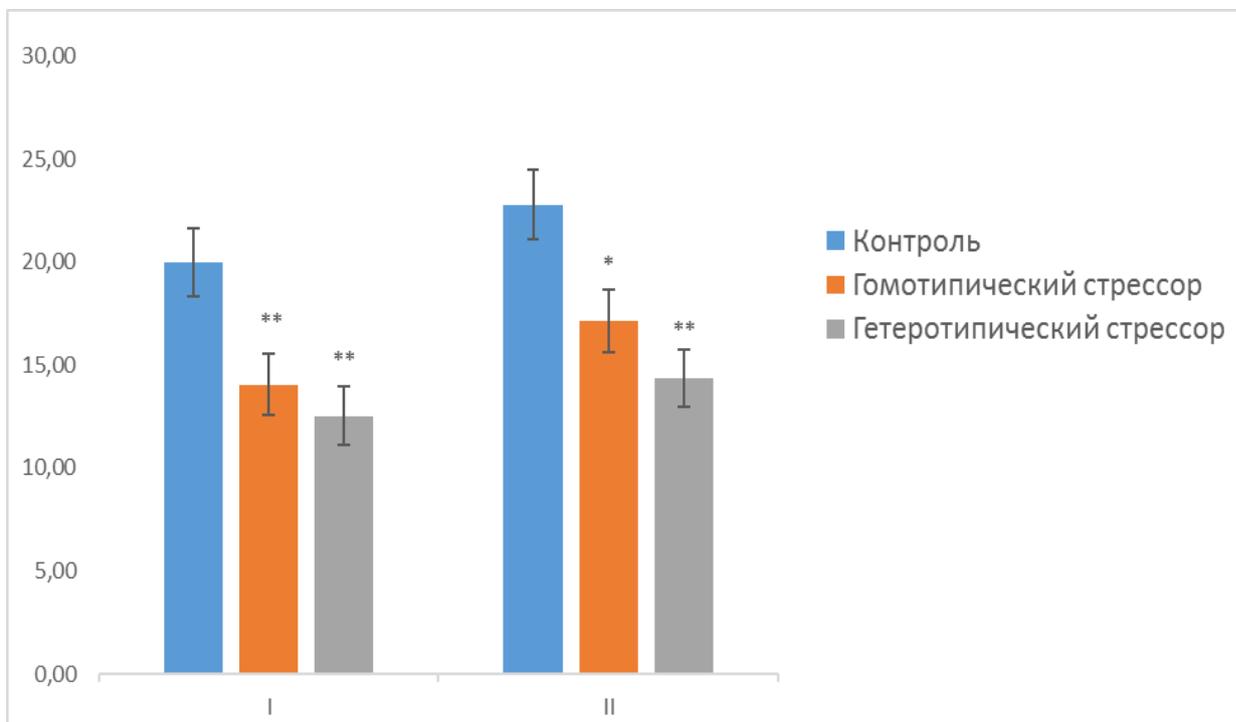


Рисунок 3. Удельная площадь CD8⁺ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

По горизонтальной оси: I – инфантильный возраст; II – перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$. Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

Таким образом, хронический стресс, как гомо-, так и гетеротипический, вызывал достоверное 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 разным уровнем значимости различий у двух стресс-групп и у отдельных субпопуляций лимфоцитов. Доля CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов снижалась достоверно в обеих экспериментальных группах с большим уровнем различий между двумя экспериментальными группами у животных перипубертатного периода, чем у крыс инфантильного возраста.

При изучении динамики количества CD90+ и CD20+ лимфоцитов при обоих видах стресса выявлены однонаправленные тенденции (рис. 4).

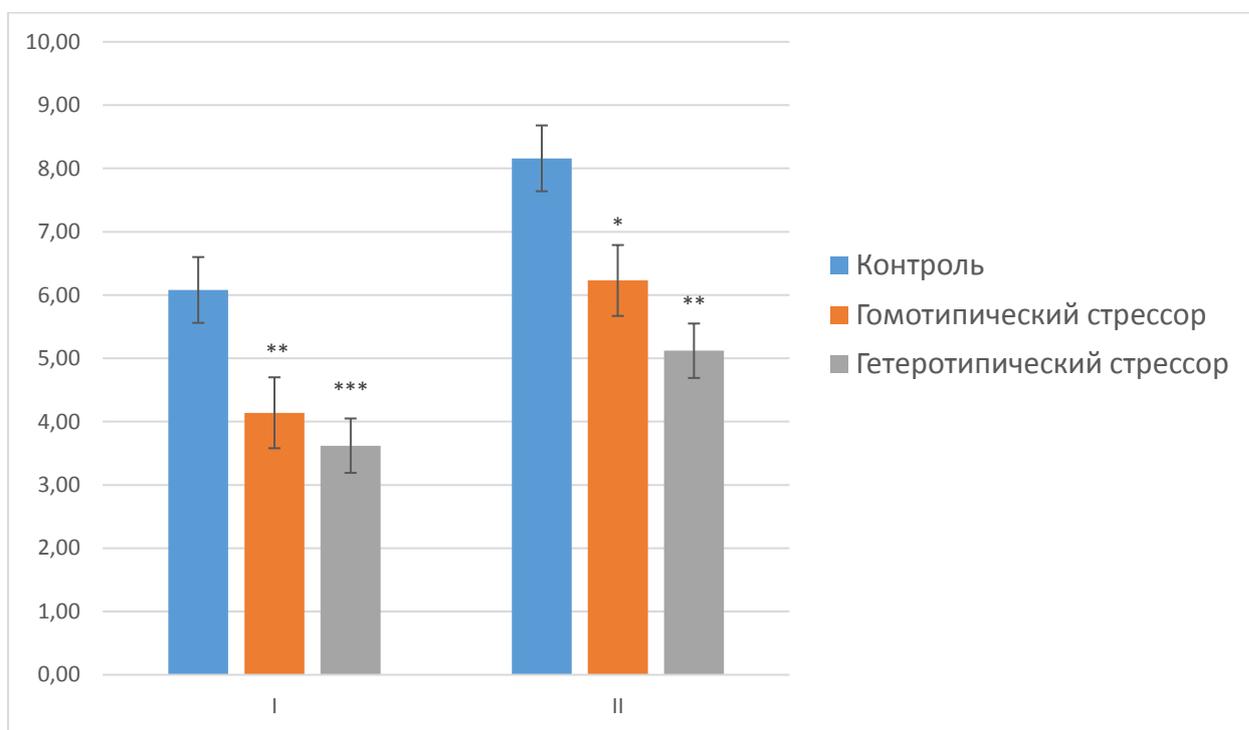


Рисунок 4. Удельная площадь CD90+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

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.

Доля CD90+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного возраста составила $6.08 \pm 0.54\%$, перипубертатного возраста - $8.16 \pm 0.69\%$. Под воздействием гомотипического стресса численность CD90+ лимфоцитов достоверно уменьшилась и составила у животных инфантильного периода $4.14 \pm 0.47\%$ ($p < 0,01$). У крыс перипубертатного возраста удельная площадь CD90+ лимфоцитов на фоне гомотипического стресса изменилась менее отчетливо и составила $6.23 \pm 0.66\%$ ($p < 0,05$). При гетеротипическом стрессе численность CD90+ лимфоцитов по сравнению с контролем достоверно уменьшилась и составила $3.62 \pm 0.35\%$ у животных инфантильного ($p < 0,001$) и - $5.12 \pm 0.51\%$ перипубертатного возраста ($p < 0,01$). Обращает

внимание более выраженное снижение доли CD90+иммунореактивных клеток у крыс обеих возрастных групп при действии гетеротипических стрессоров, при этом наибольшие различия между двумя экспериментальными группами отмечены у животных инфантильного возраста ($p < 0,01$).

Изучение клеточной популяции CD20+ лимфоцитов при обоих видах стресса также продемонстрировало взаимосвязь динамики исследуемых показателей с характером стрессорного воздействия и возрастом экспериментальных животных (рис. 5).

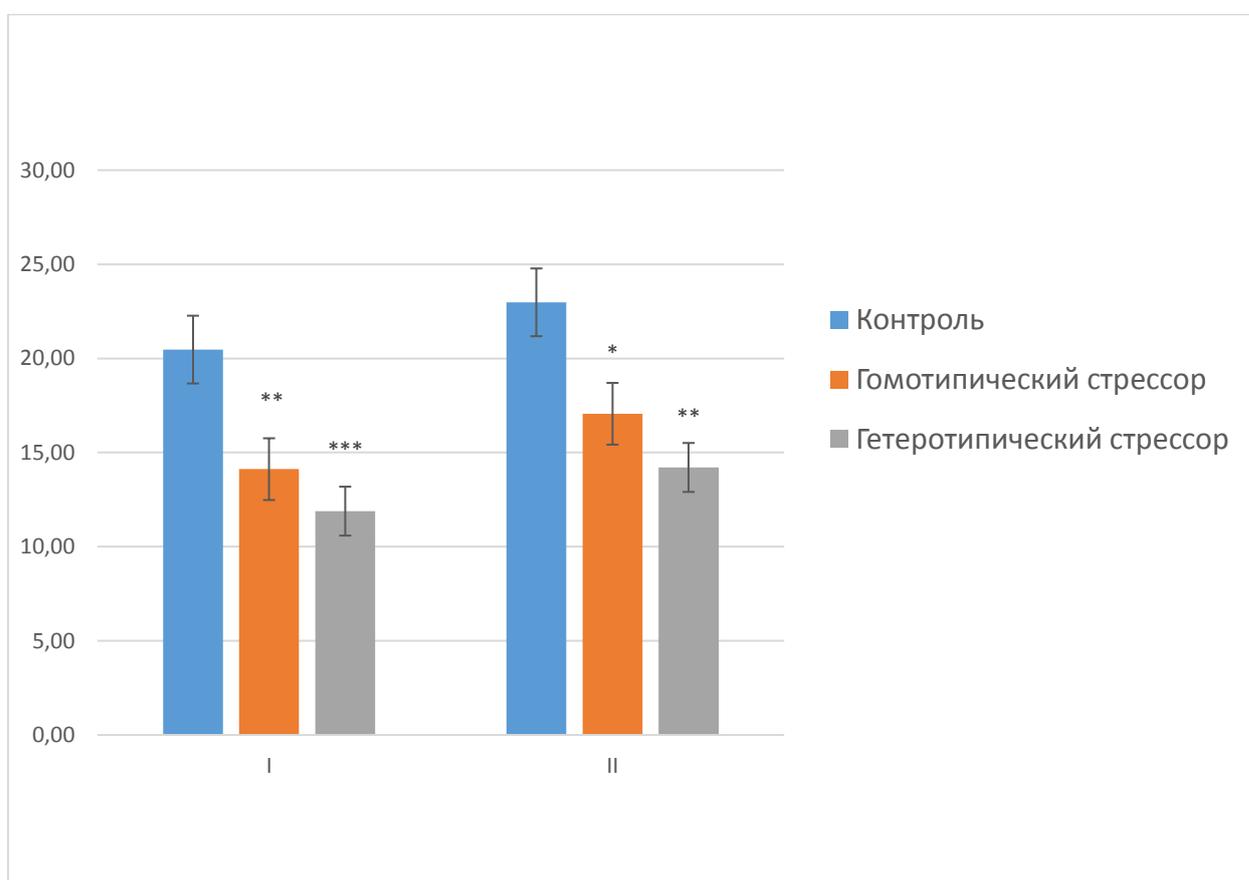


Рисунок 5. Удельная площадь CD20+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

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.

Удельная площадь CD20+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного и перипубертатного возраста составила $20.47 \pm 1.75\%$ и $22.98 \pm 2.07\%$ соответственно. Воздействие гомотипического стресса привело к достоверному по сравнению с контрольной группой снижению удельной площади CD20+иммунореактивных клеток до $14.12 \pm 1.53\%$ у крыс подсосного возраста ($p < 0,01$) и менее отчетливому, но статистической достоверному снижению доли этих лимфоцитов у крыс перипубертатного возраста – до $17.06 \pm 1.72\%$ ($p < 0,05$).

При действии гетеротипического стресса клеточная популяция CD20+ лимфоцитов достоверно уменьшилась в подгруппе крыс инфантильного возраста до $11.89 \pm 1.23\%$ ($p < 0,001$), у крыс перипубертатного возраста до $14.21 \pm 1.41\%$ ($p < 0,01$).

Обращает внимание, что так же, как при изучении популяции CD90+лимфоцитов выявлено значительно более выраженное снижение доли CD20+иммунореактивных клеток в селезенке экспериментальных крыс при действии гетеротипических стрессоров, при этом диапазон этих различий тоже имел возрастные закономерности.

Таким образом, количество CD90+ и CD20+ лимфоцитов снижалось интенсивнее у животных инфантильного периода, с более выраженным снижением показателей при гетеротипическом стрессе в обеих возрастных группах.

Изучено влияние хронического стресса на возрастную динамику двух популяций стромальных клеток: OX-62 и белок S100-иммунопозитивных (рис. 6).

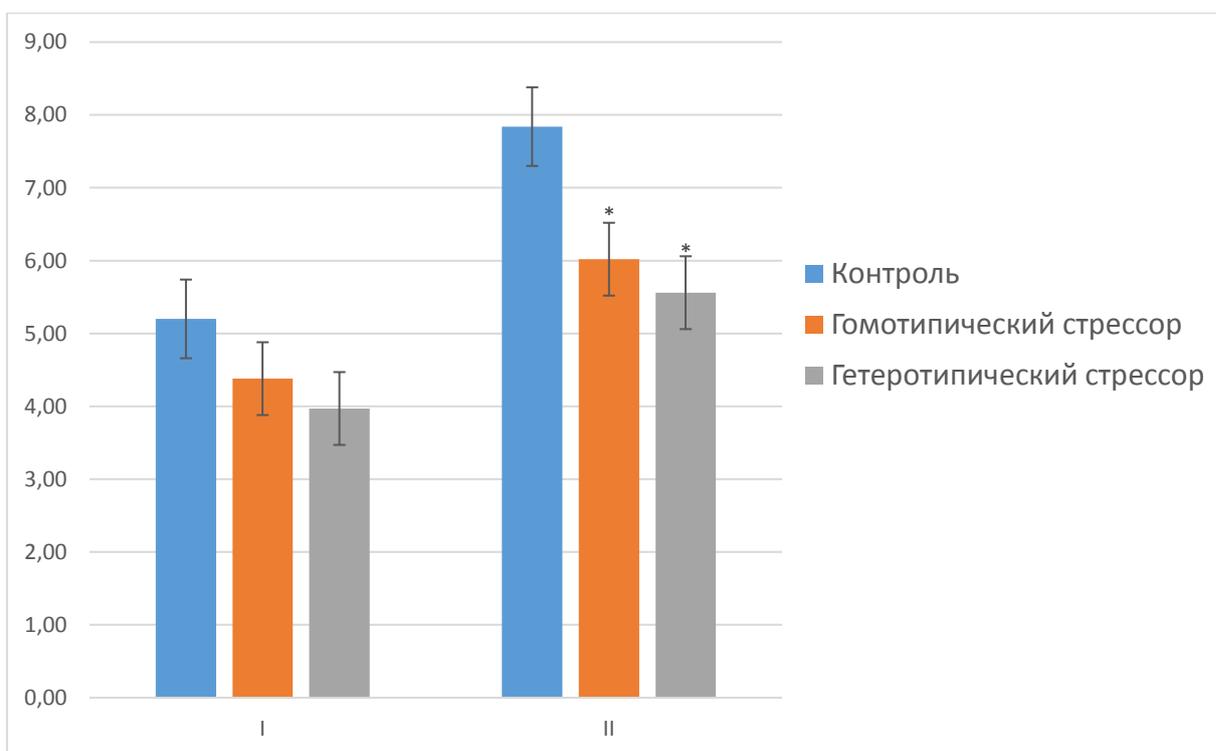


Рисунок 6. Удельная площадь OX62+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

По горизонтальной оси: I – инфантильный возраст; II – перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы:

* при $P < 0,05$. Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

Удельная площадь OX62+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного и перипубертатного возраста составила $5.20 \pm 0.48\%$ и $7.84 \pm 0.66\%$ соответственно. Изменение числа OX-62+ клеток в селезенке крыс инфантильного возраста при гомотипическом стрессе имело лишь характер тенденции, не достигшей статистической достоверности ($p > 0,05$). В то же время у крыс перипубертатного возраста воздействие гомотипического стрессора привело к достоверному снижению доли OX-62+ клеток в селезенке, которая составила $6.02 \pm 0.63\%$ ($p < 0,01$). Похожие результаты получены и при воздействии гетеротипического стрессора. Уменьшение удельной площади OX62+иммунореактивных клеток в селезенке крыс инфантильного возраста имело характер тенденции ($p > 0,05$), а у крыс перипубертатного возраста под воздействием гетеротипического

стрессора изменение числа ОХ-62+ клеток было статистически значимым и составило $5.56 \pm 0.57\%$ ($p < 0,01$). Таким образом, у животных инфантильного возрастного периода количество ОХ-62+ клеток при стрессе менялось незначительно, в то время как у крыс перипубертатного возраста оно достоверно снижалось при действии обоих видов стрессоров с минимальными различиями между двумя стресс-группами.

Противоположная динамика имела место при изучении влияния хронического стресса на популяцию s100+иммунореактивных клеток в селезенке экспериментальных крыс (рис. 7).

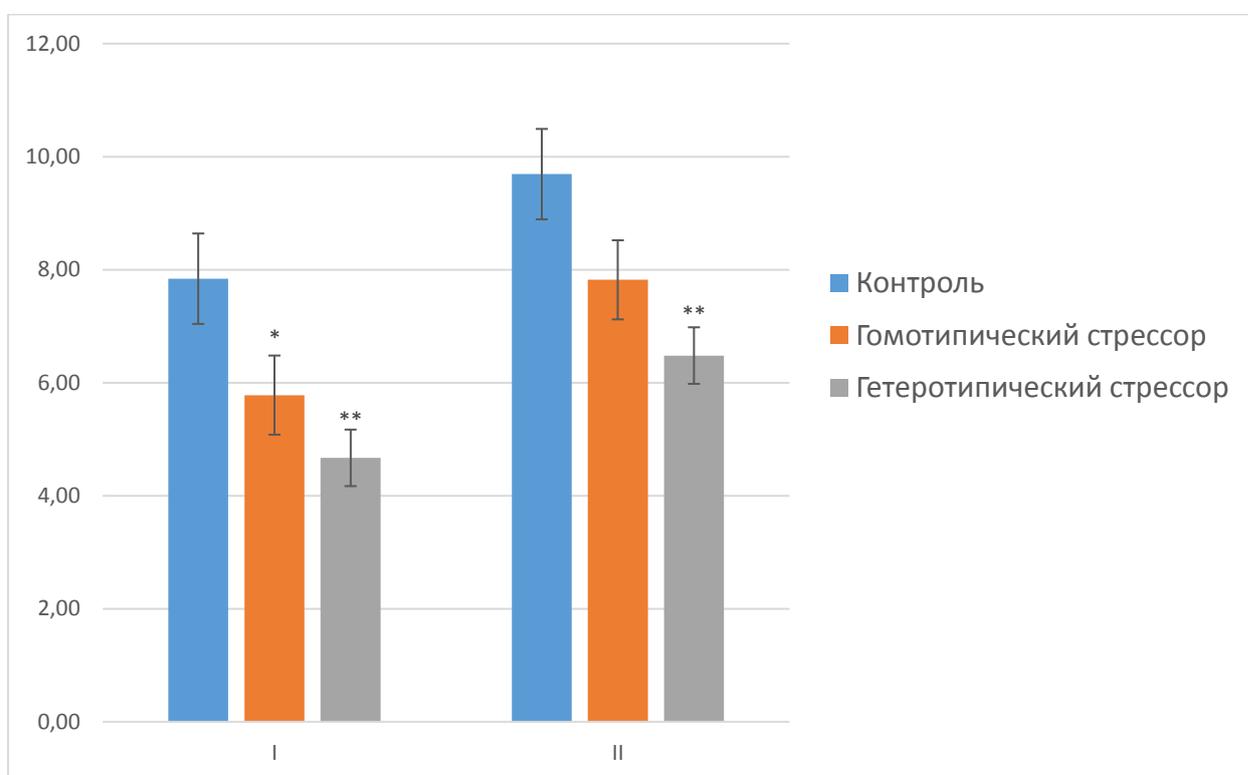


Рисунок 7. Удельная площадь s100+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

По горизонтальной оси: I – инфантильный возраст; II – перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы:

* при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$. Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

Удельная площадь s100+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного и перипубертатного возраста составила $7.84 \pm 0.76\%$ и $9.69 \pm 0.93\%$ соответственно. У животных инфантильного

периода число s100+иммунореактивных клеток при гомотипическом стрессе достоверно снизилось до $5.78 \pm 0.64\%$ ($p < 0,01$), а у крыс перипубертатного возраста эти изменения были статистически незначимыми, доля s100+иммунореактивных клеток составила $7.82 \pm 0.81\%$ ($p > 0.05$). При действии гетеротипического стрессора произошло достоверное уменьшение доли s100+иммунореактивных клеток у животных обеих возрастных групп, показатели количества s100+иммунореактивных клеток составили $4.67 \pm 0.49\%$ и $6.48 \pm 0.68\%$ соответственно ($p < 0,01$).

Для выяснения механизмов стресс-ассоциированной динамики популяций лимфоидных и дендритных клеток проведен анализ содержания PCNA- и каспаза-3-иммунореактивных клеток (рис.8, 9).

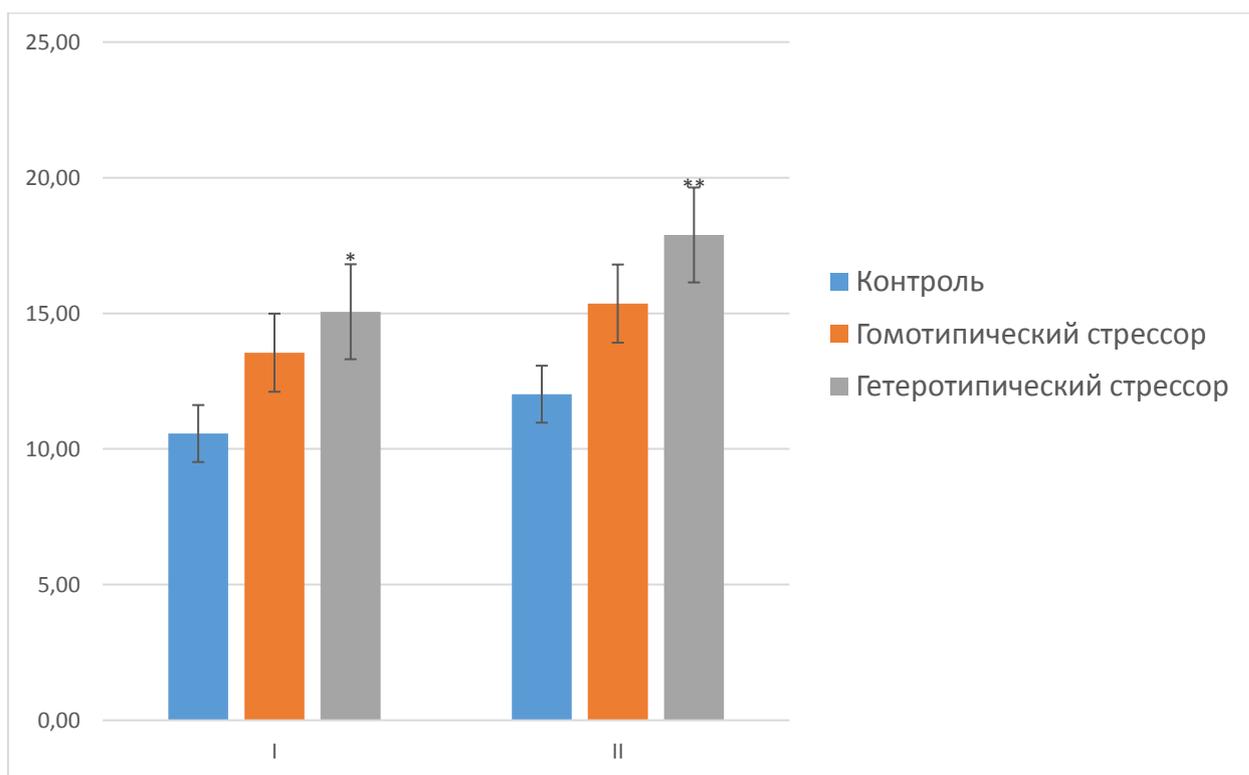


Рисунок 8. Удельная площадь каспаза-3+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

По горизонтальной оси: I – инфантильный возраст; II – перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы:

* при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$. Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

Удельная площадь каспаза-3+иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного и перипубертатного возраста составила $10.57 \pm 0.95\%$ и $12.02 \pm 1.14\%$ соответственно. При действии гомотипических стрессоров тенденция к увеличению количества каспаза-3+иммунореактивных клеток в селезенке экспериментальных крыс и инфантильного и перипубертатного возраста не достигла статистической значимости ($p > 0.05$).

При действии гетеротипического стрессора произошло достоверное увеличение числа каспаза-3+иммунореактивных клеток до $15.06 \pm 1.68\%$ ($p < 0,01$) у крыс инфантильного возраста. У животных перипубертатного возраста при гетеротипическом стрессе различия по сравнению с контрольной группой были еще более выраженными - удельная площадь каспаза-3+иммунореактивных клеток составила $17.89 \pm 1.83\%$ ($p < 0,001$).

Удельная площадь PCNA+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных крыс инфантильного и перипубертатного возраста составила $15.06 \pm 1.48\%$ и $18.14 \pm 1.63\%$ соответственно. При действии гомотипических стрессоров изменение числа PCNA+ иммунореактивных клеток у крыс обеих возрастных групп было статистически недостоверным ($p > 0.05$).

Воздействие гетеротипического стрессора привело к достоверному уменьшению доли PCNA+ иммунореактивных клеток у крыс инфантильного возраста до $11.47 \pm 0.95\%$ ($p < 0,01$). У животных перипубертатного возраста при действии гетеротипического стрессора различия по сравнению с контрольной группой были еще более выраженными - удельная площадь PCNA +иммунореактивных клеток уменьшилась до $12.62 \pm 1.14\%$ ($p < 0,001$).

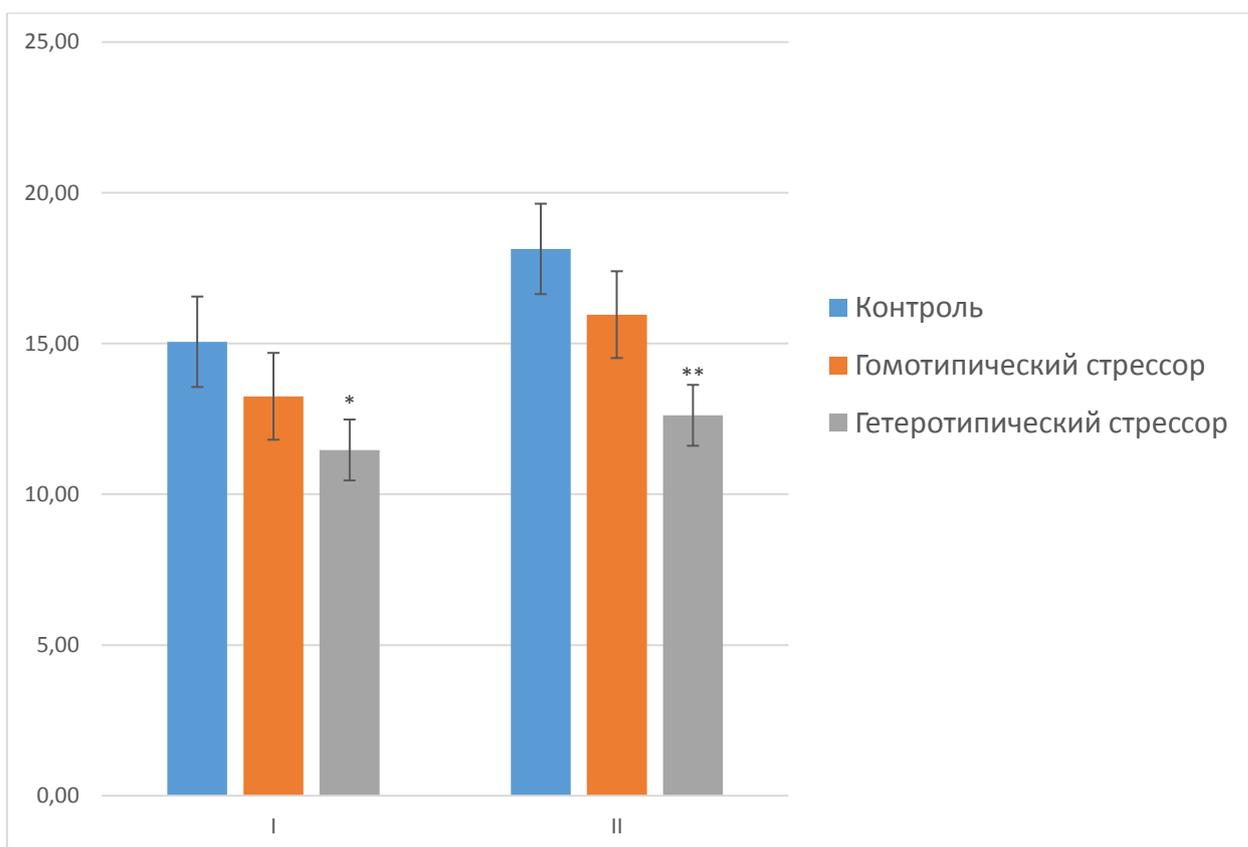


Рисунок 9. Удельная площадь PCNA+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

По горизонтальной оси: I – инфантильный возраст; II – перипубертатный возраст; исследованный показатель (%). Различия по сравнению с контролем значимы: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$. Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки.

Таким образом, удельная площадь клеток, несущих маркер апоптоза, достоверно изменяется в обеих возрастных группах лишь при гетеротипическом стрессе, причем с большим уровнем значимости у перипубертатных животных.

Суммируя результаты морфометрического исследования и имидж анализа селезенки крыс разных возрастных групп при воздействии гомо- и гетеротипического стресса, можно констатировать, что хронический стресс как гомо-, так и гетеротипический вызывает микроскопические изменения в селезенке, проявляющиеся уменьшением объема Т- и В-зон белой пульпы, маргинальной зоны вокруг них, снижением плотности расположения клеток как в Т-зонах, так и в В-зонах. Иммуногистохимическая реакция на различные

группы дендритных клеток, лимфоцитов и клеток, гибнущих путем апоптоза, показала влияние обоих видов стресса на динамику всех изучаемых 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.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкий диапазон иммуномодулирующих эффектов стресса от стимулирующего до глубокого угнетающего действия на иммунную систему организма человека и экспериментальных животных показан в многочисленных исследованиях последних лет [5,11,12].

Данные о воздействии стресса на гуморальный и клеточный иммунный ответ весьма противоречивы: по мнению одних авторов при стрессе страдает, прежде всего, гуморальный иммунный ответ [17,40,121], по мнению других – клеточный [114,117,157], по мнению третьих – оба вида иммунного ответа [88]. В то время как подавляющее большинство исследователей трактуют стресс как однозначно иммуносупрессивный [118,135], некоторые авторы указывают на иммунопотенцирующее действие стресса [79], существуют работы, в которых указывается на неспособность стресса изменить иммунный статус организма [67].

Вектор стресс-ассоциированной иммуномодуляции зависит от многих факторов, как внешних так и внутренних, среди которых ведущими внешними факторами считаются продолжительность и тип стрессорного воздействия, а внутренними – возраст, пол испытуемого, тип приспособительного поведения и предыдущий опыт стрессорных экспозиций.

Известно, что почти все клеточные элементы, участвующие как во врожденном, так и приобретенном иммунитете, подвержены возрастному ремоделированию. Действие на организм любых иммуномодулирующих факторов, в том числе таких, как хронический стресс, во время активного роста способствует наложению возрастных изменений на индуцированные сдвиги, что может оказать драматическое действие на иммунный ответ.

Среди периферических органов иммуногенеза селезенка - орган, в наибольшей степени чувствительный к действию стресса.

Исследование взаимодействия в селезенке стромальных и паренхиматозных элементов считается одним из наиболее перспективных направлений развития

представлений об органах иммуногенеза с целью получения возможности регулирования иммуномодуляционных изменений [27,80,134,144,171], так как нормальный иммунный ответ требует координации между лимфоидными и добавочными клетками, и в нормально функционирующем организме в лимфоидных органах создается необходимое микроокружение для эффективного взаимодействия Т-, В- и антиген-презентирующих клеток для выработки адекватного иммунного ответа [49,102].

В последнее время появился целый ряд работ, посвященных изучению влияния хронического гетеротипического стресса, т.е. стрессорного воздействия с меняющимся стрессором, которое чаще всего встречается в современных условиях [88] и затрагивает главным образом нейроэндокринную систему. Продемонстрировано, что активация гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной оси при повторном действии гомотипического стресса снижается, а гетеротипического – напротив, усиливается [118,135].

Влияние гетеротипического стресса на иммунную систему растущего организма остается практически неизученным.

Самыми серьезными последствиями перенесенного стресса считаются не единичные трансформации иммунной, эндокринной, нервной и других важных систем организма, а изменения в целом функционирования органов, приводящие к поломке гомеостаза. Достаточно длительное время доминировали представления об автономности иммунной системы. Однако последние годы было показан жесткий контроль нейроэндокринной системы над ее функционированием.

Эти представления появились после выявления клеток лимфоидного ряда рецепторов к гормонам, а также к нейротрансмиттерам. Обнаружено, что они способны сами экспрессировать различные мессенджеры. Это способствует четкой координированности взаимоотношений между популяциями лимфоидных клеток в центральных и периферических органах иммунного контроля. Органы, отвечающие за иммунный ответ, имеют

симпатическую иннервацию, а в самой нервной системе синтезируются медиаторы иммунной системы, что позволяет нейроиммуноэндокринной системе функционировать как единому целому, давая организму возможность приспосабливаться к действию различных неблагоприятных стрессоров.

Накоплена большая информация, но тонкие механизмы постстрессовой иммуномодуляции изучены недостаточно полно, в связи с чем было предпринято настоящее исследование, призванное оценить иммуномодулирующего действия стресса на морфологию селезенки при действии гомо- и гетеротипических стрессоров и понять основные иммуноморфологические механизмы, способствующие появлению индуцированной стрессом иммуномодуляции на различных этапах постнатального онтогенеза [67,87,131,164,171],.

Иммуносупрессия, обусловленная стрессом - процесс многофакторный. Стресс различных видов - острый или хронический стресс, слабый или сильный стрессор - способен оказать противоположное воздействие на иммунокомпетентные органы. Такие факторы, как пол, возраст животного, испытывающего воздействие стресса, а также характеристики стресса: преодолеваемость, избегаемость, предсказуемость и индивидуальный опыт воздействия стресса – эти параметры определяют иммуномодуляцию и должны учитываться при прогнозировании степени обусловленной стрессом иммуносупрессии.

Описание адаптационных реакций и морфологических изменений, возникающие в органах иммуногенеза после воздействия стресса весьма противоречиво. Эта ситуация связана с тем, что большинство исследований проводилось без учета специфики компарментов лимфоидных органов. Возрастным изменениям в компартаментах селезенки необходимо уделять особое внимание, поскольку их изменения на самых ранних этапах постнатального онтогенеза вносят решающий вклад во взаимоотношение гемопоэтических и стромальных клеточных популяций микроанатомических зон.

Направленность этих процессов в различные возрастные периоды имеет очень большое значение для понимания нейроэндокринологической регуляции иммунного ответа. С этой точки зрения наиболее важными в развитии иммунной системы могут считаться ранние этапы постнатального онтогенеза, поскольку эти периоды максимально чувствительны к иммуносупрессивному воздействию различных видов стресса. Но именно эти периоды остаются наименее исследованными.

В этой связи нами было проведено изучение постстрессовых иммуномодуляционных изменений в селезенке растущего организма. Нами использовано две модели стресса – гомо – и гетеротипический, которые считаются средним и сильным по действию стрессорными воздействиями. Представлялось важным проследить, как степень зрелости иммунной и нейроэндокринной систем способна повлиять на выраженность иммуноморфологических изменений в селезенке при различных видах стресса.

Основным проявлением возрастных сдвигов в селезенке как наиболее сложно компартиментализованном иммунном органе, является изменение ее зональности и клеточности каждой из зон. Среди причин этих изменений указываются возрастные изменения миграции иммуноцитов, изменения пролиферации, масштабов и скорости гибели лимфоидных клеток и нарушение сигнальных взаимоотношений между ними. Влияние каждого из этих механизмов иммуномодуляции имеет различное значение в разные возрастные периоды

. До последнего времени возрастная иммуномодуляция в селезенке изучалась преимущественно с использованием иммунологических методов, не учитывающих особенностей микроиммуноморфологии различных зон на ее территории.

В целом, доля иммунореактивных клеток увеличивается с возрастом, как показало сравнение срезов селезенки контрольных животных. Увеличивается

также объем структур, содержащих скопления иммунореактивных клеток (лимфоидных узелков, маргинальной зоны селезенки).

Сразу после окончания стрессорного воздействия у экспериментальных животных мы наблюдали резкое уменьшение клеточности в белой пульпе селезенки, уменьшение объема Т-зон (периартериальных лимфоидных влагалищ), редукцию В-зон (лимфоидных узелков и маргинальной зоны), усиление апоптотических процессов, которые проявлялись значительным увеличением количества макрофагов с неокрашенной цитоплазмой с апоптотическими тельцами, эти изменения касались как В-, так и Т-зон и были максимально выражены в Т-зонах у крыс инфантильного периода и В-зонах животных перипубертатного возраста.

При изучении динамики морфологии Т- и В- зон было выявлено, что иммуномодуляционные изменения в большей степени затрагивают Т-клеточные компоненты селезенки, в сравнении с В-клеточными. Эта ситуация может быть объяснена различиями в степени зрелости стромально-мезенхимальных элементов Т- и В- компартментов селезенки в описываемые возрастные периоды.

При сравнении динамики иммуноморфологических изменений в лимфоидных структурах селезенки выявлена большая степень взаимозависимости В-лимфоцитов от окружающих их фолликулярных элементов. Что касается Т-лимфоцитов, то при заселении Т-зон они проявляли относительную автономность от прилежащих стромальных клеток.

Такие особенности возможно обусловлены различиями в строении рецепторного аппарата у этих видов клеток. Исследование этих различий не входило в задачи данного исследования, но они безусловно представляют большой интерес в научных работах такого рода.

Антиген-специфические В-клетки эффективно подвергаются клональной экспансии в центрах размножения, соматическим мутациям, переключению изотипов, и в ответ на появление Т-зависимых антигенов экспрессируют плазмциты и клетки памяти. Функционирование таких

центров связано с динамичным взаимодействием между В-, Т- лимфоцитами и ФДК. Некоторые авторы считают, что ФДК имеет важное значение в сохранении В-клеточных элементов герминативных центров, причем не обязательно из-за их способности уменьшать их ВКР-медиированный апоптоз. В большей степени это обусловлено их участием в пролиферации и дифференцировке В-клеток как антиген-зависимым, так и антиген-независимым способом. Дифференцировку В-клеток индуцируется активированными Т-клетками [70,111, 130,173].

Большая часть исследований демонстрирует, что основная функция ФДК – предотвращение апоптоза и поддержка пролиферации и роста В-клеток центров размножения, а не их дифференцировки, в то же время активированные Т-клетки индуцируют дифференцировку В-клеток центров размножения путем предоставления CD40L и цитокинов [44,158,156].

Важной задачей нашей работы было уточнение механизмов постстрессовой иммуносупрессии, поэтому мы посчитали необходимым включить в наше исследование метод имидж-анализа для более тонкой оценки изменений в компартментах селезенки, динамики стресс-ассоциированных сдвигов и их возрастных особенностей. Он включает иммуноцитохимические методы с последующей цифровой обработкой изображения.

Имидж-анализ является наиболее чувствительным и специфичным методом в современных морфологических исследованиях.

Иммуногистохимическая реакция на различные группы дендритных клеток, лимфоцитов и клеток, гибнущих путем апоптоза, показала влияние обоих видов стресса на динамику данных клеточных популяций.

Уменьшение доли CD8+ клеток селезенки было связано с интенсивностью действия стрессора: при гетеротипическом стрессе лишь единичные иммунореактивные клетки отмечались во внутренней зоне ПАЛВ, в то время как при гомотипическом стрессе они персистировали и в наружной зоне ПАЛВ, и в маргинальной зоне.

После воздействия стресса имело место заметное снижение удельной доли НТИ – клеток с фенотипом CD90+ . Изменение удельной площади CD90+ позволило продемонстрировать разреженность иммунопозитивных клеток в селезенке, значительно сильнее выраженную при гетеротипическом стрессе по сравнению с гомотипическим стрессом, а при последнем – по сравнению с контролем.

Изучение динамики распределения CD90+ клеток показало, что данный показатель, характеризующий траффик лимфоидных клеток из «центра» на «периферию» достоверно снижался у крыс всех возрастов. Такая динамика CD90+ иммунореактивных клеток обусловлена активацией симпатической нервной системы. Содержание CD90+ иммунореактивных клеток оказалось самым чувствительным маркером в оценке иммуномодуляционных изменений в селезенке при разных видах стресса. Этот показатель с высоким уровнем значимости различался у животных экспериментальных и контрольных групп всех возрастов при каждом виде стресса.

Некоторые исследователи считают, что иммобилизационный стресс, оказывает влияние на Т-лимфоциты значительно в большей степени, чем на В-клетки. Другими исследователями показано, что этот вид стресса напротив в большей степени влияет на В-клетки и CD8+ Т-клетки, чем на CD4+ Т-клетки в селезенке, что связано с адренергической стимуляцией, интенсивность которой обусловлена количеством бета-адренорецепторов у лимфоцитов, а оно оказалось различным у разных типов клеток (больше у В-клеток и CD8+клеток, меньше у CD4+клеток) [90,100,162,169]

Считается, что параметры приобретенного иммунного ответа реализуются с помощью Т- и В-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток. Противоположные данные получены другими авторами с применением количественной иммуногистохимии. Некоторые вторы допускают, что ФДК наиболее очевидный источник антигенов, необходимых для дифференцировки В-клеток центров размножения, и что основная масса

пролиферирующих В-клеток гибнет путем апоптоза. Имидж-анализ показал присутствие макрофагов с клеточными детритами по всему центру размножения, причем максимальная клеточность отмечалась в месте нахождения более густой сети ФДК. На основании полученных данных можно согласиться с мнением тех авторов, которые считают, что ФДК вовлечены во вступление В-клеток на путь апоптоза [128,151], на что указывает их тесный контакт с ФДК.

Существуют исследования, которые продемонстрировали, что некоторые ФДК экспрессируют Fas-лиганд. Такие данные свидетельствуют, что ФДК могут играть важную роль в апоптозе В-клеток герминативных центров через взаимодействия Fas-Fas-лиганд.

Мы произвели оценку нескольких возможных механизмов постстрессовой гипоплазии селезенки: уровня пролиферации клеток (окрашивание на PCNA), гибели апоптозом (окрашивание на каспазу-3).

При окраске на PCNA площадь иммунореактивных клеток в ПАЛВ снижалась умеренно в инфантильной группе и резко – в перипубертатной экспериментальной группе

Экспрессия PCNA по-разному снижалась при гомо- и гетеротипическом стрессе, при гетеротипическом стрессе: с большей достоверностью у крыс перипубертатного возраста по сравнению с крысами, взятыми в эксперимент в инфантильный период. Выявлена схожесть в снижении экспрессия PCNA в селезенке при обоих видах стресса. Стоит отметить, что самые существенные различия этого показателя в обеих экспериментальных группах отмечены при гетеротипическом стрессе и в старшей возрастной группе. Это демонстрирует необходимость определенной степени зрелости иммунной системы для дифференцировки вида стрессорного воздействия.

Активированные Т-клетки участвуют в регуляции фолликулярных дендритных клеток. И фолликулярные клетки В-зон и интедицитирующие клетки Т-зон гибнут каспаза-3-медиированным апоптозом. Как и при других методах окрашивания, различия между экспериментальными группами

выражены ярче, при окрашивании на каспазу-3. Выявилось, что увеличение количества клеток, гибнущих путем апоптоза, находилось в прямой корреляции с частотой выявления макрофагов с апоптозными тельцами. Изменение реакции на каспаза-3-иммунореактивные клетки было заметно выше при гетеротипическом стрессе у животных перипубертатной экспериментальной группы.

Увеличение экспрессии каспазы-3 отмечалось главным образом в лимфоидных узелках и ПАЛВ. Доказано, что активация ГГНС и повышение содержания кортикостероидов в крови приводит к повышению уровня апоптоза. Различия в степени повышения данного параметра в разных возрастных группах свидетельствует с одной стороны о меняющейся чувствительности к действию кортикостероидов и с другой стороны о степени зрелости самой ГГНС в растущем организме.

Существуют экспериментальные данные, доказывающие, что воздействие хронического стресса у крыс приводит к появлению в селезенке значительного числа макрофагов с неокрашенной цитоплазмой и с присутствием в ней апоптозных телец [143]. Аналогичные изменения были выявлены и в нашем исследовании. Такие результаты свидетельствуют о том, что интенсивности апоптоза можно судить также по количеству макрофагов с апоптозными тельцами в цитоплазме, а повышение после воздействия стресса расшифровывает важнейший механизм гипоплазии иммунных органов при стрессе – избыточный апоптоз иммуноцитов.

При анализе полученных нами данных выявлялась отчетливая тенденция: максимальная степень снижения клеточных популяций в селезенке после воздействия обоих видов стресса отмечалась у животных инфантильного периода, что может быть связано с особенно высокой чувствительностью органов иммуногенеза к действию стресса после перехода на самостоятельное питание.

Вследствие функциональной незрелости иммунной системы, хрупкого баланса между врожденным и приобретенным иммунным ответом в раннем

возрасте, усиление силы стрессорного воздействия приводит к нарастающей гипоплазии периферических иммунных органов, прежде всего селезенки, причем в инфантильном периоде в большей степени повреждается Т-клеточный компартмент, а в перипубертатном – и Т-, и В-зоны.

Проведенное нами исследование показало, что иммуноцитохимические методы оценки уровня иммуномодуляционных изменений достаточно чувствительны для того, чтобы уже на качественном уровне оценить направленность сдвигов большинства иммунных параметров в селезенке при различных видах стрессового воздействия у животных разных возрастных групп. С их помощью было продемонстрировано, что стресс вызывает изменения в селезенке, преимущественно соответствующие состоянию иммуносупрессии: снижение клеточности (преимущественно в белой пульпе и маргинальной зоне), уменьшение доли супрессоров/цитотоксических CD8+клеток (в ПАЛВ), доли PCNA-иммунореактивных клеток, отражающий пролиферативные потенции клеточных популяций в большей степени в лимфоидных узелках, ПАЛВ и маргинальной зоне.

Из литературных данных известно, что процессы пролиферации и клеточной гибели контролируются глюкокортикоидами. Стресс является адаптационным физиологическим ответом живых систем на реальную или воображаемую угрозу жизни [B.K.Choudhury et al., 2009]. Он инициирует в организме цепь интегрированных реакций эндокринной, нервной и иммунной систем. Такие реакции обусловлены активацией гипоталамо-гипофизарно-адренортикальной (ГГАО) и симпато-адреналовой осей, что приводит к высвобождению глюкокортикоидов и выбросу катехоламинов: адреналина и норадреналина, обуславливающих сложные иммуномодуляционные изменения.

Высвобождение кортикотропин – рилизинг - фактора, активирующего гипоталамо-гипофизарно-адренортикальную нейроэндокринную ось, приводит к высвобождению группы гормонов и нейротрансмиттеров, как системно, так и селективно в тканях определенных органов. Высвобождение

нейротрансмиттеров вызывает практически немедленный ответ со стороны органа-мишени, в то же время более постепенное высвобождение гормонов эндокринными железами может увеличивать и поддерживать стрессорный ответ достаточно продолжительное время [С.Л.Кузнецов и др., 2008, 2009; М.Ю.Капитонова и др., 2008; 2010; А.М. Вao et al., 2008; А.Аrmario et al., 2009].

Такие изменения особенно легко провоцируются в раннем постнатальном онтогенезе по причине морфофункциональной незрелости лимфоидных органов и отсутствия прочных связей между ними, их компартментами и субкомпартментами. [22,40,66,71,86,123,147], выброс различных медиаторов в кровь при стрессе связан с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [63], причем уровень функциональной зрелости последней также весьма динамично меняется на ранних стадиях постнатального онтогенеза.

Как уже указывалось, глюкокортикоиды оказывают как позитивный, так и негативный эффект на иммунное состояние организма, обусловленное мощным двусторонним действием на лимфопозз и различные компоненты иммунного ответа. Продемонстрировано, что иммунодепрессивный эффект глюкокортикоидов связан преимущественно с угнетающим действием на Т-лимфоциты, главным образом, Т-хелперы. ГКС вызывают модуляцию генов, которые вовлечены в примирование врожденного иммунного ответа. Кортикостероиды воздействуют на их транскрипцию и на рецепторы к гормонам у Т-клеток [87,93].

Селезенка имеет значительное количество внутриклеточных рецепторов к глюкокортикоидам. Важной мишенью кортикостероидов служат дендритные клетки – один из ключевых компонентов врожденного иммунного ответа, через которые стероидные гормоны также оказывают свое иммуносупрессивное действие. Нарушение созревания дендритных клеток приводит к изменению Т-клеточного иммунного ответа. Роль дендритных клеток в кортикостероидо-индуцированной иммуносупрессии установлена сравнительно недавно. С учетом ключевой роли Toll-подобных рецепторов в

инициировании созревания дендритных клеток изучена экспрессия ТПР 2, 3, 4 у дендритных клеток, обработанных кортикостероидами, а также у популяции дендритных клеток пациентов, получающие большие дозы кортикостероидов. Дифференцировка дендритных клеток в присутствии глюкокортикостероидов затрагивала только небольшую популяцию клеток с ярко выраженными отличительными признаками, которые были не способны индуцировать адекватный иммунный ответ, в то же время влияние глюкокортикоидов на процесс созревания дендритных клеток резко понижало продукцию ими IL-12 p70 и ФНО, а также их способность активировать Т-клетки [26,151,172].

Становление иммунной системы продолжается длительное время и является сложным, многоэтапным процессом. Для каждого периода характерны определенные онтогенетические особенности, в основе которых лежат геномические, функциональные, структурные, нейрогуморальные перестройки, детерминированные возрастной стратегией развития организма. Периоды повышенной чувствительности иммунной системы к действию эндо- и экзогенных повреждающих факторов (критические периоды) определяют проявление наследственных вариаций силы иммунного ответа. Действие стресса на растущий организм оказывает на него очень сильное воздействие, которое нередко сохраняется на протяжении достаточно длительного времени взрослой жизни. Воздействие стресса в критические периоды развития организма обуславливает нарушение иммунореактивности на протяжении последующей жизни, что вносит вклад в формирование повышенной чувствительности и предрасположенности к развитию стресс-индуцированной патологии [8,47,108].

Поскольку постстрессовая иммуномодуляция неотделима от паттерна активации ГГАО, логично было бы предположить, что иммуномодуляционные последствия стресса, перенесенного в раннем возрасте, также должны существенно отличаться от постстрессовых изменений более поздних возрастных периодов. Неонатальный стресс

оказывает влияние на неспецифическую резистентность к инфекциям на протяжении всей жизни [69,107,195].

Таким образом, проведенное нами 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-адренокортикальной 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 разных этапах раннего постнатального онтогенеза.

Использование иммуноморфологических методов исследования позволяет не только констатировать наличие изменений в различных популяциях иммуноцитов под влиянием стрессоров, но локализовать их по отделам лимфоидных органов.

Знание механизмов изменения микроморфологии селезенки позволит разрабатывать адекватные методы профилактики постстрессового иммунодефицита с учетом возрастных особенностей стресс-ассоциированной иммуномодуляции.

ВЫВОДЫ

1. Перенесенный в инфантильном и перипубертатном периодах онтогенеза хронический стресс вызывает изменения иммуноархитектоники селезенки, выраженность которых определяется видом стрессоров и возрастом, на который приходится их воздействие. При начале хронического стрессорного воздействия в инфантильном возрасте, гипоплазия лимфоидной ткани селезенки выражена больше, чем в перипубертатном периоде.

2. Хронический стресс при действии как гомо-, так и гетеротипических стрессоров вызывает уменьшение клеточности в белой пульпе селезенки, уменьшение объема Т-зон, редукцию В-зон, маргинальной зоны вокруг них, снижении плотности расположения клеток как в Т-зонах, так и в В-зонах, также усиление апоптоза, которое проявляется увеличением числа макрофагов с неокрашенной цитоплазмой, захвативших апоптозные тельца. Эти изменения более выражены в Т-зонах животных инфантильного возраста и В-зонах крыс перипубертатного возраста.

3. Хронический стресс, как гомо-, так и гетеротипический, вызывает значимое уменьшение удельной площади как Т-, так и В-клеточных популяций в обеих возрастных подгруппах, причем при действии гетеротипических стрессоров это снижение более выражено. Доля CD8⁺- и CD4⁺-лимфоцитов снижается в обеих экспериментальных группах с большим уровнем различий у животных перипубертатного возраста. Количество CD90⁺- и CD20⁺- лимфоцитов уменьшается значительно у животных инфантильного, чем перипубертатного возраста.

4. Хронический стресс оказывает влияние на возрастную динамику популяций стромальных клеток: OX-62- и белок S100- иммунопозитивных. У инфантильных животных число OX-62⁺-клеток при стрессе меняется незначительно, в то время как у крыс перипубертатного возраста оно снижается при действии обоих видов стрессоров.

5. Удельная площадь фолликулярных дендритных клеток при гомотипическом стрессе достоверно снижается лишь у животных инфантильного возраста, при гетеротипическом стрессе - в обеих возрастных группах, причем с большим уровнем значимости, чем при гомотипическом стрессе.

6. Удельная площадь клеток, несущих маркер апоптоза, больше меняется при гетеротипическом стрессе. Содержание каспаза-3-иммунопозитивных клеток увеличивается, а PCNA- иммунопозитивных клеток уменьшается у животных в перипубертатном возрасте.

7. Иммунные изменения, опосредованные различными видами стресса, накладываются на сложные возрастные перестройки органов иммунной и эндокринной систем, наблюдаемые до наступления половой зрелости у крыс, что формирует отличающиеся иммуномодуляционные изменения при гомо- и гетеротипическом стрессе на разных этапах раннего постнатального онтогенеза.

Практические рекомендации

Рекомендуется применение различных по природе стрессоров (гомо- и гетеротипических) для выявления тонких механизмов влияния стресса на микроархитектонику селезенки на ранних стадиях постнатального онтогенеза, что позволит определить подходы к профилактике вторичного иммунодефицита при стрессе в различные возрастные периоды.

Для объективизации наблюдений и получения наиболее информативных критериев оценки постстрессовых изменений в селезенке рекомендуется изучение показателей динамики клеток, иммунореактивных по CD8+, CD90+, белок S100+, CD20+ , OX-62- и белок S100- иммунопозитивных, а также несущих маркер апоптоза, и использовать их при внедрении новых методов профилактики постстрессовой иммуносупрессии.

Рекомендуется применение иммуногистохимических методов исследования и имидж-анализа для более тонкой оценки изменений в компартментах селезенки, определения механизмов и динамики стресс-ассоциированных изменений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГГНО – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
- ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
- Г.-Э. – гематоксилин-эозин.
- ДАБ – диаминобензидин
- КРФ – кортикотропин-рилизинг-фактор
- АКТГ – адренкортикотропный гормон
- PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток
- ПВЯ – паравентрикулярное ядро гипоталамуса
- ЦНС - центральная нервная система
- АКТГ - адренкортикотропный гормон
- АОК — антителообразующие клетки
- АПК – антиген-презентирующая клетка
- ВКР – В-клеточный рецептор
- Г.-Э. – гематоксилин-эозин.
- ГГНО – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
- ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
- ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа
- ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
- КРФ – кортикотропин-рилизинг-фактор
- НТИ – недавние тимусные иммигранты
- ПАЛВ – периартериальное лимфоидное влагалище
- ТКР – Т-клеточный рецептор

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. - М.: Медицина, 1990. -384с.
2. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринология: истоки и перспективы развития // Усп. физиол. наук.- 2003.- Т.34.- N4.- С.4-15.
3. Алиев М.А., Беляев Н.Н., Рысулы М.Р. и др. Влияние хирургического стресса на уровень циркулирующих CD34+-гемопоэтических стволовых клеток: анализ возможных факторов мобилизации. Цитокины и воспаление. - 2008.- Т.7.- №2.- С.45-48.
4. Альфонсова Е.В. Функциональная морфология селезенки при респираторном ацидозе //Современные проблемы науки и образования. 2012. № 2. с. 85
5. Андреева А.Ю., Дробот Г.П., Пигалин А.Л., Вараксина Е.Н. Морфология селезенки потомства состояние системы гемостаза у больных с острым геморрагическим инсультом // Современные проблемы медицины и естественных наук сборник статей Всероссийской научной конференции. фгбоу во «марийский государственный университет». 2017. с. 256-260.
6. Бахмет А.А. Строение лимфоидных структур селезенки крыс при воздействии острого эмоционального стресса // Морфология. - 2004.- Т.126.- N1.- С.55-58.
7. Башина С.И. Возрастная морфология селезёнки свиньи в постнатальный период онтогенеза//Известия оренбургского государственного аграрного университета. 2013. № 2 (40). с. 102-104.
8. Баясхаланова Ц.Б., Санданова Б.Б., Чимбуева А.Б., Власова Н.В. Влияние астрагала перепончатого на морфологию тимуса и селезенки при иммунодефиците// Медицина завтрашнего дня Материалы хв межрегиональной научно-практической конференции студентов и

- молодых ученых, посвященной 65-летию читинской государственной медицинской академии: сборник научных трудов. Читинская государственная медицинская академия. 2018. с. 262-263.
9. Боков Д.А. Параметры функциональной морфологии селезёнки мелких млекопитающих и оценка условий перестройки системы крови и иммунитета при действии факторов газоперерабатывающего производства // Известия самарского научного центра российской академии наук. 2015. т. 17. № 5-2. с. 327-332.
 10. Вайдо А.И., Дюжикова Н.А., Ширяева Н.В. и др. Системный контроль молекулярно-клеточных и эпигенетических механизмов долгосрочных последствий стресса // Генетика.- 2009.- Т.45.- N3.- С.342-348.
 11. Вишневская Т.Я., Абрамова Л.Л. Функциональная морфология лимфоидной ткани селезенки и крови на фоне стресса и при влиянии препарата "гамавит" // Актуальные вопросы постдипломного образования в ветеринарной медицине материалы международной научно-практической конференции. 2013. с. 66-70.
 12. Вишневская Т.Я., Абрамова Л.Л. Показатели биохимии крови и морфологии селезенки кроликов при стрессе // Актуальные вопросы постдипломного образования в ветеринарной медицине материалы международной научно-практической конференции. 2013. с. 63-66.
 13. Гаврилов Ю.В., Корнева Е.А.. Взаимодействие нервной и иммунной систем при стрессе // Мед. академ. ж. - 2009. – Т.9.- N1.- С.11-27.
 14. Гаврилов Ю.В., Перекрест С.В., Новикова Н.С., Корнева Е.А. Стресс-индуцированные изменения реакций клеток гипоталамических структур на введение антигена (липополисахарида) (по экспрессии c-fos белка) // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2006. т. 92. № 11. с. 1296-1304.
 15. Галеева Э.Н., Железнов Л.М. Особенности анатомии и топографии селезенки человека в раннем плодном периоде онтогенеза // Вестник новых медицинских технологий. 2013. т. 20. № 2. с. 278-282. 0

16. Галочкин В.А., Галочкина В.П., Агафонова А.В., Черепанов Г.Г. Межсистемные связи иммунитета, нейроэндокринной регуляции и факторов питания в свете концепции общего иммунофизиологического контроля резистентности // Проблемы биологии продуктивных животных. 2016. № 3. с. 24-46.
17. Геворгян М.М., Альперина Е.Л., Куликов А.В., Идова Г.В. Изменение содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови и селезенке у мышей линии ASC (Antidepressant sensitive catalepsy) с наследственной предрасположенностью к депрессиво-подобному поведению. // Иммунология, - 2013, №5- с 262-265
18. Гейн С.В., Шаравьёва И.Л. Влияние блокады опиоидных рецепторов на антителогенез и пролиферативный ответ спленоцитов при стрессе // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013. т. 76. № 1. с. 30-34.
19. Гейн С.В., Баева Т.А., Гейн О.Н. и др. Роль моноцитов в реализации эффектов b-эндорфина и селективных агонистов d-опиатных рецепторов на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови // Физиология человека. 2006. - Т. 32. — С. 111-116.
20. Гольдберг О.А., Подкаменев В.В. Морфология повреждений селезенки // Неоперативное лечение повреждений селезенки в детском возрасте saarbrucken, 2015. с. 90-95.
21. Горобец Т.Н., Жданов О.И. Стресс: сущность, функция, значение // Мир психологии. - 2008. - Том 56, N 4 . - С. 45-54.
22. Долгих Т.И., Шелев М.В., Белкова Т.Н., Нестеренко Э.В. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови новорожденных детей различного срока гестации с внутриутробной инфекцией. // Медицинская иммунология: 2010, - Т. 12, № 4-5, - стр. 417-420
23. Долгушин И.И., Пешикова М.В., Бабик Р.К. и соавт. Особенности кинетики CD34⁺ клеток у детей при разных вариантах воспаления. // Медицинская иммунология . 2010.-N 4.-С.319-324.

24. Зайцева Е.В., Башина С.И. К возрастной морфологии селезенки свиньи в постнатальном онтогенезе // Дальневосточный аграрный вестник. 2012. № 4 (24). с. 20-22. 0
25. Зубова С.В., Волошина Е.В., Косякова Н.И., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Активация мононуклеаров крови человека липополисахаридами разного состава. // Медицинская иммунология: 2010, - Т. 12, № 4-5, -стр. 405-408
26. Ирьянов Ю.М., Очеретина Р.Ю. Морфология пострадиационного восстановления селезенки крыс // Фундаментальные исследования. 2006. № 3. с. 71.
27. Камышный А.М., Топол И.А. Механизмы активации кишечной ассоциированной лимфоидной ткани в условиях хронического социального стресса // Медицинская иммунология. 2015. т. 17. № 5. с. 455-460.
28. Капитонова М.Ю., Кузнецов С.Л., Клаучек С.В., Мохд Исмаил З.И., Улла М., Федорова О.В. Особенности акцидентальной инволюции тимуса в растущем организме при воздействии различных видов стрессоров // Морфология.- 2006.- Т.130.- №.- С.56-61.
29. Капитонова М.Ю., Кузнецов С.Л., Фуад С.Б.С.А., Дегтярь Ю.В., Хлебников В.В., Нестерова А.А., Чернов Д.А. Иммуногистохимическая характеристика селезенки при действии различных видов стрессоров // Морфология. 2009. т. 136. № 5. с. 61-66.
30. Клейменов И.С. Отдельные аспекты морфологии селезенки у новорожденных поросят в норме и при иммунодефиците // Генетика, молекулярная биология и биохимия сельскохозяйственных животных 2005. с. 29-32.
31. Лавин Е.А., Цейликман В.Э., Крупицкая Л.И. и др. Перекисное окисление белков и гипоплазия селезенки при иммобилизационном стрессе // Медицинская иммунология.- 2007.- Т.9.- N2-3.- С.149.

- 32.Лаковников Е.А., Парфенов А.Ф. Цитологический состав паренхимы селезенки поросят 2- и 4-месячного возраста // Морфология.- 2005.- Т.127.-N1.- С.41-42.
- 33.Ланин Д.В., Зайцева Н.В., Долгих О.В. Нейроэндокринные механизмы регуляции функций иммунной системы //Успехи современной биологии. 2011. т. 131. № 2. с. 122-134.
- 34.Ланин Д.В., Лебедева Т.М. Воздействие химических факторов среды обитания на функции и взаимосвязи регуляторных систем у детей //Гигиена и санитария. 2016. т. 95. № 1. с. 94-96.
- 35.Ланин Д.В.,Зайцева Н.В., Долгих О. В. Молекулярные основы действия и иммуномодулирующие эффекты глюкокортикоидных гормонов // Иммунология. 2010. - №6. - С. 334-337.
- 36.Михайлова М.Н., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Кострова О.Ю. Морфология селезенки потомства спленэктомированных крыс-самок на фоне постнатального введения канцерогена //Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2016. т. 24. № s2. с. 120
- 37.Михайлова М.Н., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Арлашкина О.М., Кострова О.Ю. Морфология селезенки потомства спленэктомированных крыс при экспериментальном канцерогенезе // Современные проблемы медицины и естественных наук сборник статей международной научной конференции. 2016. с. 9-12.
- 38.Мороз Г.А., Кривенцов м.а. морфофункциональные особенности селезенки неполовозрелых крыс линии вистар при повторяющемся гипергравитационном воздействии //Вестник проблем биологии и медицины. 2011. т. 2. № 2. с. 188-191.
- 39.Немирович-Данченко Е.А., Фомичева Е.Е. Влияние пролактина на изменение концентрации кортикостерона в крови и интенсивность иммунологических реакций у крыс при стрессе// Медицинская иммунология. 2002. т. 4. № 4-5. с. 613-618.

40. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Сапун О.И. Фенотипические характеристики субпопуляций моноцитов CD64+CD16-CD32+CD11b+, CD64+CD16+ CD32+CD11b+, CD64-CD16+ CD32+CD11b+ при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных // Иммунология, 2014, №1,- с 29-33
41. Нурланов Э.Н., Умаров Д.И., Иванина В. А Морфология селезенки и лимфатических узлов при экспериментальной артериальной гипертензии //в сборнике: Неделя науки - 2017 материалы всероссийского молодёжного форума с международным участием. 2017. с. 525-526.
42. Обернихин С.С., Яглова Н.В. Структурно-функциональные изменения органов иммунной системы при развитии системного воспалительного ответа у потомства самок мышей, перенесших стимулирующее воздействие на иммунную систему в ранние сроки беременности. //Иммунология, - 2014, №1,- с 9-14
43. Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки// Иммунология. 2006, -27 (6).-С. 368-378
44. Поздняков О.Б., Елисеева Т.И., Герасимов Н.Б., Кузин А.П., Елисеева И.В., Крылов А.А. Особенности морфологии изолированных макрофагов селезенки крыс при воздействии компонентов анестезии// Журнал анатомии и гистопатологии. 2015. т. 4. № 3. с. 98.
45. Садыкова Н.Н. Морфология и кровоснабжение селезенки кролика в возрастном аспекте //Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Морд. гос. ун-т им. Н.П. Огарева. Саранск, 2014
46. Садыкова Н.Н. Морфология и кровоснабжение селезенки кролика в возрастном аспекте //Морфология. 2016. т. 149. № 3. с. 177.
47. Сапин М.Р. Лимфатическая система и ее значение в иммунных процессах // Морфология.- 2007.- Т.131.- N1.- С.18-22.

48. Сарыева О.П. Морфология тимуса, селезенки, надпочечников и особенности физического развития крыс под влиянием гуминовых соединений // Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / научно-исследовательский институт морфологии человека рампн. москва, 2006
49. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические белки неспецифического иммунитета // Иммунология. 2005 - 26 (6). - С. 368-378
50. Смирнова Т.С., Ягмуров О.Д. Строение и функции селезенки // Морфология.- 1993.- Т.104.- №5-6.- С.142-159.
51. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Арлашкина О.М. Морфофункциональные изменения селезенки и тимуса крысят, родившихся от спленэктомированных крыс-самок // Успехи современного естествознания. 2014. № 9-2. с. 70-72.
52. Судаков К.В. Эволюция концепции стресса // Вестн.Росс.Акад.Мед.Наук.- 2008.- Т.11.- С.59-66.
53. Тендитник М.В., Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В., Кудрявцева Н.Н., Труфакин В.А. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов иммунокомпетентных органов мышей под влиянием хронического социального стресса // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова .- 2004.- Т.90.- N12.-С.1522-1529
54. Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Копылова Г.Н. и др. Влияние острого и многократного умеренного стресса на нарушения реактивности лимфатических сосудов брыжейки крыс при воспалении // Бюлл.экс.биол.мед. - 2009. – Т.148.- N12.- С.604-607.
55. Учакин П.Н., Учакина О.Н., Тобин Б.В., Ершов Ф.И. Нейроэндокринная регуляция иммунитета // Вестник российской академии медицинских наук. 2007. № 9. с. 26-32.
56. Фалина Л.И., Волкова Л.В. Акцидентальная инволюция лимфоидных органов и оценка межклеточных взаимодействий // Морфология.- 2007.- Т.131.- N3.- С.62.

57. Федорова Н.Н., Ложниченко О.В., Коляда М.Н., Есина О.И., Алтуфьева Н.С., Берберова Н.Т. Влияние соединений олова и тетрафенилпорфирина на морфологию селезенки крыс // Вестник астраханского государственного технического университета. 2005. № 3 (26). с. 222-227.
58. Федотчев А.И. Стресс, его последствия для человека и современные нелекарственные подходы к их устранению // Успехи физиол. наук . - 2009. – Т.40.- N1.- С.77-91.
59. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Дробленков А.В., Любимов А.В. Отсроченные поведенческие и морфологические последствия активации системы стресса-антистресса в раннем онтогенезе у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология -2009. - Том 72.- N 6.- С. 7-14
60. Шакирова Г.Р., Шакирова Д.М. Функциональная морфология селезенки и лимфатических узлов овец при экспериментальном фасциолезе // Современные тенденции инновационного развития ветеринарной медицины, зоотехнии и биологии. Материалы всероссийской очно-заочной научно-практической конференции с международным участием. Башкирский государственный аграрный университет. 2017. с. 196-200.
61. Шакирова Г.Р., Шакирова Д.М. Функциональная морфология селезенки и лимфатических узлов овец при экспериментальном фасциолезе // Современные тенденции инновационного развития ветеринарной медицины, зоотехнии и биологии. Материалы всероссийской очно-заочной научно-практической конференции с международным участием. башкирский государственный аграрный университет. 2017. с. 196-200.
62. Шалак М.В., Дубина Н.А., Плавский В.Ю., Громов И.Н. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на морфологию селезенки индюшат // Животноводство и ветеринарная медицина. 2016. № 3. с. 29-33.

63. Шаршембиев Д.А. Морфология тимуса и селезенки в условиях воздействия на организм иммуномодуляторов на основе полиоксидония // Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московская медицинская академия". Москва, 2004
64. Шевцов А.Р., Головнев В.А., Голубева И.А. Морфология селезенки в норме, при моделировании синдрома длительного сдавления и в условиях применения полифенолов манжетки обыкновенной // Вестник новосибирского государственного университета. серия: биология, клиническая медицина. 2006. т. 4. № 3. с. 62-65.
65. Шефер Е.Г. Постстрессовая иммуноморфология периферических лимфоидных органов в возрастном аспекте // Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 2011.- 207 с.
66. Шилов Д.Ю., Шилов Ю.И., Черешнев В.А. Влияние содалола гидрохлорида на иммунный ответ при остром стрессе // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. - № 2/1 (24). - С. 63-64.
67. Шубина Т.П., Чопорова Н.В. Сравнительная морфология селезенки разных животных // Актуальные направления инновационного развития животноводства и современные технологии производства продуктов питания материалы международной научно-практической конференции. 2016. с. 112-115.
68. Abramson J., Giraud M., Benoist C., Mathis D. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance // Cell. 2010. - Vol. 140(1).-P. 123-35
69. Azpiroz A., De Miguel Z., Fano E., Vegas O. Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice // Brain Behav. Immunol.- 2008.- Vol.22.- N5.- P.690-698.

70. Ayala-García M.A., Soel J.M., Diaz E., González B., Paz F.J., Cervantes F., Rodea E., Muñoz G., Rodríguez J.S., Gutiérrez J., Malacara J.M. Induction of tolerance in renal transplantation using splenic transplantation: experimental study in a canine model // *Transplant. Proc.* - 2010. - Vol.42. - N1. - P.376-380.
71. Azpiroz A., De Miguel Z., Fano E., Vegas O. Relations between different coping strategies for social stress, tumor development and neuroendocrine and immune activity in male mice // *Brain Behav. Immunol.* - 2008. - Vol.22. - N5. - P.690-698.
72. Bellinger D.L., Millar B.A., Perez S. et al. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease // *Cell. Immunol.* — 2008. Vol. 252(1-2). - P. 27-56.
73. Bénéard A., Boué J., Ghapey E., Jaume M., Gomes B., Dietrich G. Delta, opioid receptors mediate chemotaxis in; bone marrow-derived dendritic cells // *Journal of Neuroimmunology.* -2008. V. 197. - P. 21-28.
74. Berczi I., Quintanar-Stephano A. Integration and coordination of bodily functions by niss // *Insights to neuroimmune biology: second edition 2016.* c. 107-129.
75. Bertrand J.Y., Desanti G.E., Lo-Man R., Leclerc C., Cumano A., Golub R. Fetal spleen stroma drives macrophage commitment // *Development.* - 2006. - Vol.133. - N18. - P.3619-3628.
76. Bowers S. L., Bilbo S. D., Dhabhar F. S., Nelson R.J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice // *Brain, Behavior, and Immunity.* 2008. - V. 22. - P. 105-113.
77. Carter Robert W, Clare Thompson, Delyth M. et al. Preferential Induction of CD4+ T Cell Responses through In Vivo Targeting of Antigen to Dendritic Cell-Associated C-Type Lectin-1//*The Journal of Immunology.* 2006. Vol. 177. P. 2276-2284
78. Chavan S.L., Ogata M. Epidural anaesthesia and stress-induced immunosuppression // *British journal of anaesthesia.* 2007. т. 98. № 6. c. 847.

79. Choudhury B.K., Shi X.Z., Sarna S.K. Norepinephrine mediates the transcriptional effects of heterotypic chronic stress on colonic motor function II // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009. Vol. 296, № 6. P. 1238-1247.
80. Churin A.A., Masnaya N.V., Borsuk O.S., Sherstoboev E.Y. Reactions of Immune System to Immobilization Stress in Inbred Mice of Different Strains // *Bull Exp Biol Med.* 2003. - V. 136. - P. 266-9.
81. Collier C.T., Williams P.N., Carroll J.A., Welsh T.H. Jr, Laurenz J.C. Effect of maternal restraint stress during gestation on temporal lipopolysaccharide-induced neuroendocrine and immune responses of progeny // *Domest. Anim. Endocrinol.* - 2011. - Vol .40.- N1.- P.40-50.
82. Connor T.J., Brewer C., Kelly J.P., Harkin A. Acute stress suppresses proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 beta independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production // *J. Neuroimmunol.* 2005. - Vol.159.- P.119–128
83. Corthay A. How do regulatory T cells work? // *Scand. J. Immunol.* -2009. Vol. 70 (4). - P. 326-336.
84. Cotecchia S. The adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* — 2010. Vol. 30 (6).-P. 410-419.
85. Cotecchia S. The adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* — 2010. Vol. 30 (6).-P. 410-419
86. Cottrell E.C., Mercer J.G., Ozanne S.E. Postnatal development of hypothalamic leptin receptors // *vitamins & hormones.* 2010. т. 82. с. 201-217.
87. Deng Z., Xu C. Role of the neuroendocrine antimicrobial peptide catestatin in innate immunity and pain // *acta biochim biophys sin (shanghai).* 2017. т. 49. № 11. с. 967-972.
88. Diao J., Winter E., Cantin C., Chen W., Xu L., Kelvin D., Phillips J., Cattral M.S. In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors

- contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue // *J. Immunol.* - 2006.- Vol.176.- N12.- P.7196-7206.
- 89.Djordjevic J., Djordjevic A., Adzic M. et al. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats // *Physiol. Res.* 2010. - Vol. 59 (5). - P. 729-736.
- 90.Dunser M.W. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress // *J. Intensive Care Med.* 2009. - Vol. 24 (5).-P. 293-316.
- 91.El-Iethy H., Huber-Eicher B., Jungi T.W. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses // *Veterinary immunology and immunopathology.* 2003. т. 95. № 3-4. с. 91-101.
- 92.Elenkov I.J., Chrousos G.P. Stress system organization, physiology and immunoregulation // *Neuroimmunomodulation.* - 2006. - Vol. 13. - P.257.267.
- 93.Fleshner M. Stress-induced sympathetic nervous system activation contributes to both suppressed acquired immunity and potentiated innate immunity: the role of splenic ne depletion and extracellular hsp72 // *neural and neuroendocrine mechanisms in host defense and autoimmunity* 2006. с. 26-56. -1
- 94.Fleshner M., Kennedy S.L., Johnson J.D., Day H.E.W., Greenwood B.N. Exercise and stress resistance: neural-immune mechanisms // *The neuroimmunological basis of behavior and mental disorders* 2009. с. 87-107.
- 95.Fujimoto Y, Tedder TF CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. *J Med Dent Sci.* 2006 Jun;53(2):85-93
- 96.Garcia A., Marti O., Valles A., Dal-Zotto S., Armario A. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure // *Neuroendocrinology.*- 2000.- Vol.72.- N2.- P.114-125.

97. Gavrilov Yu. V., Perekrest S.V., Novikova N.S., Korneva E.A. Stress-induced changes in cellular responses in hypothalamic structures to administration of an antigen (lipopolysaccharide) (in terms of c-fos protein expression) // *Neuroscience and behavioral physiology*. 2008. Т. 38. № 2. с. 189-194.
98. Gezici A.R., Karakas A., Ergiin R., Giindiiz B. Serum Cortisol levels following acute experimental spinal cord injury // *Neurol. Neurochir. Pol.* 2009. - Vol. 43 (4). - P. 352-357.
99. Godbole p., Stringer M.D. Splenectomy after paediatric trauma: could more spleens be saved? // *british journal of surgery*. 2001. Т. 88. № 1.
100. Greenwood B.N., Kennedy S., Smith T.P., Fleshner M., Campeau S., Day H.E.W. Voluntary freewheel running selectively modulates catecholamine content in peripheral tissue and c-fos expression in the central sympathetic circuit following exposure to uncontrollable stress in rats // *Neuroscience*. 2003. Т. 120. № 1. с. 269-281.
101. Glaser R., Kiecolt-Glaser, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health // *Nat. Rev. Immunol.*- 2005.-3 Vol 3 .5.- P.243–251.
102. Haddad J.J., Saadé N.E., Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis // *Journal of neuroimmunology*. 2002. Т. 133. № 1-2. с. 1-19.
103. Han A.Y., Zhang M.H., Zuo X.L., Zheng S.S., Zhao C.F., Feng J.H., Cheng C. Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broiler chickens. *Poult Sci* 2010 Oct ; 89(10):2063-70
104. Hazeldine J, Arlt W, Lord JM. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2010. -Vol. 120 (2-3).-P. 127-136.
105. Hiriot A., Drapiera A.-M., Memet S. et al Wild-derived mouse strains, a valuable model to study B cell responses // *Mol.Immunol.* 2009. - V. 46. - P.601-612.

106. Holsboer F., Ising M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy // *Annu Rev Psychol* . 2010. - V. 61.-P. 81-109.Holsboer F., Ising M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy // *Annu Rev Psychol*. 2010. - V. 61.-P. 81-109.
107. Igarashi, Medina K.L., Yokota T., Rossi M.I., Sakaguchi Comp P.C., Kincade P.W. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids // *Int. Immunol.*- 2005.- Vol .17.- N5.- P.501-511.
108. Idoва г., чеидо м., девоино л. modulation of the immune response by changing neuromediator systems activity under stress //international journal of immunopharmacology. 1997. т. 19. № 9-10. с. 535-540.
109. Igarashi, Medina K.L., Yokota T., Rossi M.I., Sakaguchi N., Comp P.C., Kincade P.W. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids // *Int. Immunol.*- 2005.- Vol.17.- N5.- P.501-511.
110. Ilmonen P., Hasselquist D., Langefors A., Wiehn Ju. Stress, Immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation// *Oecologia*. 2003. т. 136. № 1. с. 148-154.
111. Josef Neu Use of nutrition to prevent stress-induced immunosuppression in the pediatric intensive care unit: A clinical trials minefield // *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2009. т. 33. № 4. с. 440-441.
112. Kaneko T., Okiji T., Zhao L., Esgeurra R., Suda H. Heterogeneity of dendritic cells in rat apical periodontitis // *Cell Tissue Res.*- 2006
113. Karakhanova S, Meisel S, Ring S, Mahnke K, Enk AH' ERK/p38' MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur J Immunol*. 2010 Jan;40(1):254-66
114. Karlsson M.C., Guinamard R., Bolland S., Sankala M., Steinman R.M., Ravetch J.V. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone // *J. Exp. Med.*- 2003.- Vol.198.- N2.- P.333–340.

115. Khairnar U., upaganlawar A., Upasani C. Ameliorative effect of chronic supplementation of protocatechuic acid alone and in combination with ascorbic acid in aniline hydrochloride induced spleen toxicity in rats //Scientifica. 2016. Т. 2016. с. 4306984.
116. Krummen M.B., Varga G., Steinert M., Stuetz A., Luger T.A., Grabbe S. Effect of pimecrolimus vs. corticosteroids on murine bone marrow-derived dendritic cell differentiation, maturation and function // Exp. Dermatol.-2006.-Vol.15.- N1.- P.43-50.
117. Kurz C.L., Tan M.W. Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans* //Aging cell. 2004. Т. 3. № 4. с. 185-193.
118. Lathe R. Hormones and the hippocampus//Journal of endocrinology. 2001. Т. 169. № 2. с. 205-231.
119. Lee E.H., Faulhaber D., Hanson K.M., Ding W., Peters S., Kodali S., Granstein R.D. Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression // Journal of investigative dermatology. 2004. Т. 122. № 2. с. 510-517.
120. Lissoni P. The pineal gland as a central regulator of cytokine network // Neuroendocrinology letters. 2000. Т. 20. № 6. с. 343-349.
121. Liu Z., Wang L., Zhou Z., Sun Y., Wang M., Wang H., Gao D., Gao Q., Song L. The simple neuroendocrine-immune regulatory network in oyster *Crassostrea gigas* mediates complex functions // Scientific reports. 2016. Т. 6. с. 26396.
122. Liu Z., Zhou Z., Jiang Q., Qiu L., Wang L., Yi Q., Song L. The neuroendocrine immunomodulatory axis-like pathway mediated by circulating haemocytes in pacific oyster *Crassostrea gigas* // Open biology. 2017. Т. 7. № 1. с. 160289.
123. Locksley R.M. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets // J. Exp. Med. 2009. - Vol. 206 (8). - P. 1643-1646.

124. Macho L., Rovensky J., Kvetnansky R. et al. Hormone response to stress in rat strains of different susceptibility to immunologic challenge // *Endocrine Regulations*. 2008. - Vol. 42. - P. 23-28.
125. Makarenkova V.P., Bansal V., Matta B.M., Perez L.A., Ochoa J.B. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress // *J. Immunol.*- 2006.- Vol.176.- N4.- P.2085-2094.
126. Martin-Fontecha A., Sebastiani S., Hopken U.E. et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming // *J. Exp. Med.* 2003. - Vol. 198(4). - P. 615621.
127. Mastorakos G., Pavlatou M. , Diamanti-Kandarakis E., Chrousos G.P. Exercise and the stress system // *Hormones*.- 2005.- Vol.4.- P.73–89.
128. McMaster A., Chambers T., Meng Q.J. et al. Real-time analysis of gene regulation by glucocorticoid hormones // *J. Endocrinol.* — 2008. -Vol. 197 (2).-P. 205-211.
129. Mebius R.E., Nolte M.A., Kraal G. Development and function of the splenic marginal zone // *Crit. Rev. Immunol.*- 2004.- Vol.24.- N6.-449-464.
130. Moynihan J., Kruszezwska B., Madden K., Callahan T. Sympathetic nervous system regulation of immunity // *J. Neuroimmunol.* 2004. - Vol. 147 (1-2). -P. 87-90.
131. Muraille E., Giannino R., Guirnalda P., Leiner I., Jung S., Pamer E.G., Lauvau G. Distinct in vivo dendritic cell activation by live versus killed *Listeria monocytogenes* // *Eur.J.Immunol.*- 2005.- Vol.35.- N5.- P.1463-1471.
132. Muraille E., Leo O., Thieffry D., Kaufman M. Toxicity and neuroendocrine regulation of the immune response: a model analysis // *Journal of theoretical biology*. 1996. т. 183. № 3. с. 285-305
133. Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes// *Nat. Immunol.*2006. 7, 663-671

134. Nathalie C., Ponsaerts P., Van Tendeloo V. F. I., and Berneman Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells // *Journal of Leukocyte Biology*. 2007. Vol. 82'
135. Nazime K., Bryniarski K., Filipczak-Bryniarska I. The role of medicaments, exosomes and mirna molecules in modulation of macrophage immune activity // *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 2015. т. 69. c. 1114-1129.
136. Nolte M.A., Arens R., Kraus M., van Oers M.H., Kraal G., van Lier R.A., Mebius R.E. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone // *J. Immunol.*- 2004.- Vol.172.- N6.- P.3620-3627.
137. Nunez M.J., Balboa J., Rodrigo E., Brenlla J., Gonzalez-Peteiro M., Freire-Garabal M. Effects of fluoxetine on cellular immune response in stressed mice // *Neurosci. Lett.*- 2006.- Vol.396.- N3.- P.247-251.
138. Obminska-Mrukowicz B., Szczyпка M. Influences of DTC and zinc supplementation on the cellular response restoration in restrained mice // *J. Vet. Sci.*- 2005.- Vol.6.- N1.- P.25-32.
139. Okazaki S.I., Yamakawa M., Maeda K., Ohta N., Aoyagi M. Expression of glucocorticoid receptors in non-neoplastic lymphoid follicles and B cell type malignant lymphomas // *J. Clin. Pathol.*- 2006.- Vol.59.- N4.- P.410-416.
140. Parker G.A., Picut C.A. Atlas of histology of the juvenile rat. London: Elsevier, 2016.
141. Petrovsky N. Potapova A.A., Malyukova I.V., Proshlyakova E.V., Zakharova L.A. Hypothalamo-pituitary system controls the development of humoral immune response during prenatal ontogenesis in rats // *Russian journal of developmental biology*. 2002. т. 33. № 2. c. 97-101.
142. Petrovsky N. Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction // *Immunology and cell biology*. 2001. т. 79. № 4. c. 350-357.

143. Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A.M. et al. Adrenarche in the rat //J. Endocrinol. 2006. - Vol. 191 (1). - P. 301-308.
144. Plagemann A. Toward a unifying concept on perinatal programming: vegetative imprinting by environment-dependent biocybernetogenesis //Perinatal programming: the state of the art 2011. c. 243-282.
145. Potapova A.A., Maliukova I.V., Proshliakova E.V., Zakharova L.A. Hypothalamo-pituitary system controls the development of humoral immune response during prenatal ontogenesis in rats //Ontogenesis. 2002. v. 33. № 2. p. 124-129.
146. Powell N.D., Bailey M.T., Mays J.W., Stiner-Jones L.M., Hanke M.L., Padgett D.A., Sheridan J.F. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion // Brain Behav. Immunol.- 2009.- Vol.23.- N2.- P.225-231.
147. Prelog M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? // Autoimmun. Rev.- 2006.- Vol.5.- N2.- P.136-139.
148. Pruett S.B. Stress and the immune-brain communication // Pathophysiol.-2003.-Vol. 9.-P. 133-153.
149. Pruett S.B., Fan R., Zheng Q., Myers L.P., Hébert P. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol // Toxicological sciences. 2003. т. 75. № 2. c. 343.
150. Radahmadi M., Shadan F., Karimian S.M., Sadr S.S., Nasimi A. Effects of stress on exacerbation of diabetes mellitus, serum glucose and cortisol levels and body weight in rats // Pathophysiology.- 2006 Vol.13.- N1.- P.51-55.
151. Rogausch H., Bock T., Voigt K.H., Besedovsky H. The sympathetic control of blood supply is different in the spleen and lymph nodes // Neuroimmunomodulation. 2004. - Vol. 11 (1). - P. 58-64.
152. Sanders V.M. Interdisciplinary research: Noradrenergic regulation of adaptive immunity // Brain Behav. Immun. 2006. - Vol. 20 (1). - P. 1-8.

153. Sanders V.M., Straub R.H. Norepinephrine, the β -adrenergic receptor, and immunity // *Brain, behavior, and immunity*. 2002. т. 16. № 4. с. 290-332.
154. Satoh E., Edamatsu H., Omata Y. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and proliferative response in splenic lymphocytes from mice // *Stress*.- 2006.- Vol.9.- N4.- P.223-230.
155. Schwab C.L., Fan R., Zheng Q., Myers L.P., Hebert P., Pruett S.B. Modeling and predicting stress-induced immunosuppression in mice using blood parameters // *Toxicological sciences*. 2005. т. 83. № 1. с. 101.
156. Selye H. *Stress without Distress*, 1974: McClelland and Stewart Ltd., 272 p.
157. Sesti-Costa R., Ignacchiti M.D.C., C Hedraoui-Silva S., Marchi L.F., Mantovani B. Chronic cold stress in mice induces a regulatory phenotype in macrophages: correlation with increased 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression // *Brain, Behavior, and immunity*. 2012. т. 26. № 1. с. 50-60.
158. Smith E.M. Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2008. - V. 22. P. 3-14.
159. Stefan O. Schonland, Julia K. Zimmer, Consuelo M. Lopez-Benitez, Thomas Widmann, Kirk D. Ramin, Jorg J. Goronzy, and Cornelia M. Weyand Homeostatic control of T-cell generation in neonates// *Blood*, 15 August 2003, Vol. 102, No. 4, pp. 1428-1434
160. Steiniger B., Barth P., Hellinger A. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? // *Am. J. Pathol.*- 2001.- Vol.159.- P.501–512.
161. Suci-Foca N., Manavalan, J. S., Scotto, L. et al. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells// *Review. Int. Immunopharmacol.* 2005. Vol. 5. P. 7-1 Is
162. Takai K., Takahara S., Isoyama N., Tsuchida M., Matsumura M., Kishi Y., Uchiyama K., Naito K. Effects of FTY720 on rat lymphoid organs // *Transplant. Proc.*- 2004.- Vol.36.- N8.- P.2453-2456.

163. Taylor E.W. The oxidative stress-induced niacin sink (osins) model for hiv pathogenesis//Toxicology. 2010. т. 278. № 1. с. 124-130.
164. Thyaga Rajan S., Madden K.S., Teruya B., Stevens S.Y., Felten D.L., Bellinger D.L. Age-associated alterations in sympathetic noradrenergic innervation of primary and secondary lymphoid organs in female Fischer 344 rats // J. Neuroimmunol .- 2011.- Vol.233.- N1-2.- P.54-64.
165. Tomei A.A. Siegert S., Britschgi M.R. et al, Fluid flow regulates stromal cell organization and CCL21 expression in a tissue-engineered lymph node microenvironment // J. Immunol. 2009. — Vol. 183 (7). - P. 4273-4283.
166. Umar S., Shah M.A.A., Munir M.T., Ahsan U., Raza I., Chowdhury M.R., Ahmed Z. Immunosuppressive interactions of viral diseases in poultry // World's poultry science journal. 2016. т. 73. № 1. с. 121-135.
167. Wallet M., Pradip S., Tisch R. Immunoregulation of Dendritic Gells // Clinical; Medicine & Research. — 2005. — Vol: 3. P. 166-17
168. Wan Y.Y., Flavell R.A. How diverse CD4 effector T cells and their functions // J. Mol. Cell Biology. - 2009. - Advance Access published online on May 28, 2009. - P. 1-16.
169. Webster J.I., Tonelli L., Sternberg E.M. Neuroendocrine regulation of immunity // Annu. Rev. Immunol. - 2002. - Vol.20.- P.125–163.
170. Webster Marketon J.I., Glaser R. Stress hormones and immune function // Cell Immunol.- 2008.- Vol.252.- N1-2.- P.16-26
171. Welsh C.J., Steelman A.J., Mi W., Young C.R., Dean D.D., Storts R., Welsh Jr. T.H., Meagher M.W. Effects of stress on the immune response to theiler's virus - implications for virus-induced autoimmunity //Neuroimmunomodulation. 2010. т. 17. № 3. с. 169-172.
172. Whetsell M., Bagriacik E.U., Klein J.R., Seetharamaiah G.S., Prabhakar B.S. Neuroendocrine-induced synthesis of bone marrow-derived cytokines with inflammatory immunomodulating properties //Cellular immunology. 1999. т. 192. № 2. с. 159-166.

173. Witek-Janusek L., Albuquerque K., Chroniak K.R., Chroniak C., Durazo-Arvizu R., Mathews H.L. Effect of mindfulness based stress reduction on immune function, quality of life and coping in women newly diagnosed with early stage breast cancer // *Brain Behav. Immun.*- 2008.- Vol.22.- P.969–981.
174. Yin D., Zhang Y., Stuart C., Miao J., Zhang Y., Li C., Zeng X., Hanley G., Moorman J., Yao Z., Woodruff M. Chronic restraint stress modulates expression of genes in murine spleen. // *J. Neuroimmunol.* - 2006. - Vol.177.- N1-2.- P.11-17.
175. Zakharova L.A., Malyukova I.V., Proshlyakova E.V., Saprionova A.Y., Ugrumov M.V., Potapova A.A., Ershov P.V. Hypothalamo-pituitary control of the cell-mediated immunity in rat embryos: role of lhrh in regulation of lymphocyte proliferation // *Journal of reproductive immunology.* 2000. т. 47. № 1. с. 17-32.
176. Zhou H.J., Qu J.M., Qiu S.J., Ye S.L., He L.X. Anti-aspergillus Th immunity induced by dendritic cells and the effect of hydrocortisone on it // *Zhonghua Zhi.*- 2004.- Vol.27.- N7.- P.449-454.
177. Zotos D., Coquet J.M., Zhang Y. et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism // *J. Exp. Med.* 2010. - Vol. 207(2). - P. 365-378.