

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

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва - 2019 г

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор

Кузнецов Сергей Львович

Официальные оппоненты:

Лебединская Ольга Витальевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени Академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, доцент кафедры.

Ерофеева Людмила Михайловна – доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт Морфологии человека", центральная патологоанатомическая лаборатория, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО "Оренбургский государственный медицинский университет" Минздрава России.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу 119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, 37/1 и на сайте <http://sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования:

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 [Dhabhar F.S., 2014; Markes A.N., 2014; Nicolaidis J., 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 F.A., 2010; Gadek-Michalska A., 2013; Oster D., 2014]. 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 методы минимизации иммуносупрессивных последствий стресса [Ahmad A., 2014; Hu D., 2014; Li H., 2014].

Степень разработанности темы исследования. В последнее время появился ряд работ, посвященных изучению влияния хронического гетеротипического стресса, т.е. стрессорного воздействия с меняющимся стрессором [Korpi B.L., 2013; Babb J.A., 2014; Zhang B., 2014], затрагивающего, главным образом, нейроэндокринную систему. Продemonстрировано, что активация гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной оси при повторном действии гомотипического стресса снижается, а гетеротипического – напротив, усиливается [Gagliano H., 2014].

Сведений о влиянии гетеротипических стрессоров на лимфоидные органы на разных этапах постнатального онтогенезе немного. 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 В-зон с их компартментами (периартериальные лимфоидные влагища, лимфоидные узелки, маргинальная зона), отличающихся 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.

Цель исследования: 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 стромальных и лимфоидных клеток, пролиферации и апоптоза с последующим анализом изображения.
2. Изучить изменения 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 (ОХ-62- и белок S100-иммунопозитивных) в селезенке крыс инфантильного и перипубертатного периодов онтогенеза, обусловленные 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.

5. Провести сравнительную микромофологическую и иммуногистохимическую оценку хронического действия гомо- и гетеротипических стрессоров на селезенку у неполовозрелых крыс в разные возрастные периоды

Научная новизна исследования:

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).

Впервые получены данные количественного иммуногистохимического метода исследования с последующей цифровой обработкой изображения, позволяющего определить степень постстрессовой иммуномодуляции в селезенке крыс инфантильного и перипубертатного возраста .

Впервые определены особенности стресс-ассоциированной динамики CD8+, CD4+, CD90+, CD20+ субпопуляций лимфоцитов, ОХ-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.

Впервые показано, что изменения, затрагивающие популяции лимфоидных и стромальных клеток в селезенке, а также интенсивность апоптоза иммуноцитов

в разные периоды раннего постнатального онтогенеза при хроническом действии гетеротипического стресса превосходят по значимости изменения при гомотопическом стрессе.

Продemonстрировано, что нейроэндокринные и иммунные изменения, опосредованные различными видами стресса, накладываются на возрастные перестройки органов иммунной и эндокринной систем, что формирует отличающиеся иммуномодуляционные изменения при гомо- и гетеротипическом стрессе на разных этапах раннего постнатального онтогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Научные положения диссертационного исследования раскрывают закономерности стресс-ассоциированных иммуномодуляционных сдвигов при действии 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 в ее Т- и В-зонах. Диапазон этих различий связан с возрастными особенностями активации гипоталамо- гипофизарно-адренокортикальной оси при хроническом стрессе.

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 гетеротипического стресса 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, изменения при хроническом действии гетеротипических стрессоров превосходят по значимости изменения при гомотопическом стрессе.

Внедрение результатов работы в практику

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии лечебного факультета ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Степень достоверности и апробация результатов диссертационного исследования.

Достоверность полученных при проведении исследования результатов подтверждается достаточным количеством морфологического материала, репрезентативным объемом выборки проведенных исследований, адекватными методами статистической обработки данных. Методы математической обработки полученных результатов соответствуют поставленным задачам.

Материалы диссертации докладывались на итоговых научных конференциях студентов и молодых ученых ФГБОУ ВО " Волгоградский государственный медицинский университет" Минздрава России, представлены в материалах зарубежных конференций.

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 по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них - 4 (2 – оригинальные и 2 – обзорные) в изданиях,

входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук

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 67 российских и 110 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 9 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования. Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. Для решения поставленных задач был использован комплекс современных методов исследования - иммуногистохимический метод исследования и имидж-анализа. Исследования проведены с согласия Комитета по этике при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Исследование выполнено на 48 крысах породы Спрег-Дули 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 стрессов.

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 часа в день, начиная с 9 часов утра, подвергали стрессорному воздействию, в то время как животные групп возрастного контроля находились вне аудио- и видео-досягаемости 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) – маркеру стромальных клеток, 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, Z/AHP476), OX62 (клон MRC OX62) - маркеру стромальных клеток (AbDSerotec, США, MCA 1029); CD20 (клон R1N- 9D3) - маркеру пре- и зрелых В-лимфоцитов (AbDSerotec, MCA 1432).

Для визуализации применяли стрептавидин-биотин - пероксидазный метод по стандартным методикам в соответствии с рекомендациями производителей реактивов. Удельные площади иммунопозитивных клеток, окрашенных диаминобензидином в коричневый цвет, оценивали морфометрически с применением программы Image-Pro+ 8.0 (Media Cybernetics, США), транспортирующей цифровые данные в программу Excel.

Определяли среднюю арифметическую величину, среднеквадратическое отклонение, ошибку репрезентативности. Оценку значимости различий сравниваемых величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критическим уровнем значимости считали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Хронический стресс при действии как гомо-, так и гетеротипических стрессоров вызывал микроскопические изменения в селезенке. Они заключались в уменьшении объема Т- и В-зон белой пульпы, маргинальной зоны вокруг них, снижении плотности расположения клеток как в Т-зонах (периартериальные лимфоидные влагиалища), так и в В-зонах (лимфоидные узелки), а также увеличении в них количества макрофагов с неокрашенной цитоплазмой, захвативших апоптозные тельца.

В селезенке контрольных животных CD8 клетки были расположены равномерно, с высокой плотностью в периартериальных лимфоидных влагиалищах, которая была несколько выше у животных перипубертатной возрастной группы; значительно меньшее их количество определялось в маргинальной зоне, в лимфоидных узелках они отсутствовали.

После воздействия обоих видов стресса их доля в периартериальных лимфоидных влагиалищах резко уменьшилась у экспериментальных животных в обеих возрастных группах, что сопровождалось общим уменьшением объема Т-зон селезенки. Эти изменения более выражены в Т-зонах животных инфантильного возраста.

CD90-позитивные клетки концентрировались 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. Снижение числа CD90+клеток зависело от вида стресса: после гомотипического стресса в наружной зоне крупных ПАЛВ оставалось умеренное количество клеток, в то время как при гетеротипическом стрессе у крыс инфантильного возраста лишь единичные клетки определялись в мелких ПАЛВ и селезеночных тяжах.

Полученные данные морфометрического анализа отражены в рис. 1.

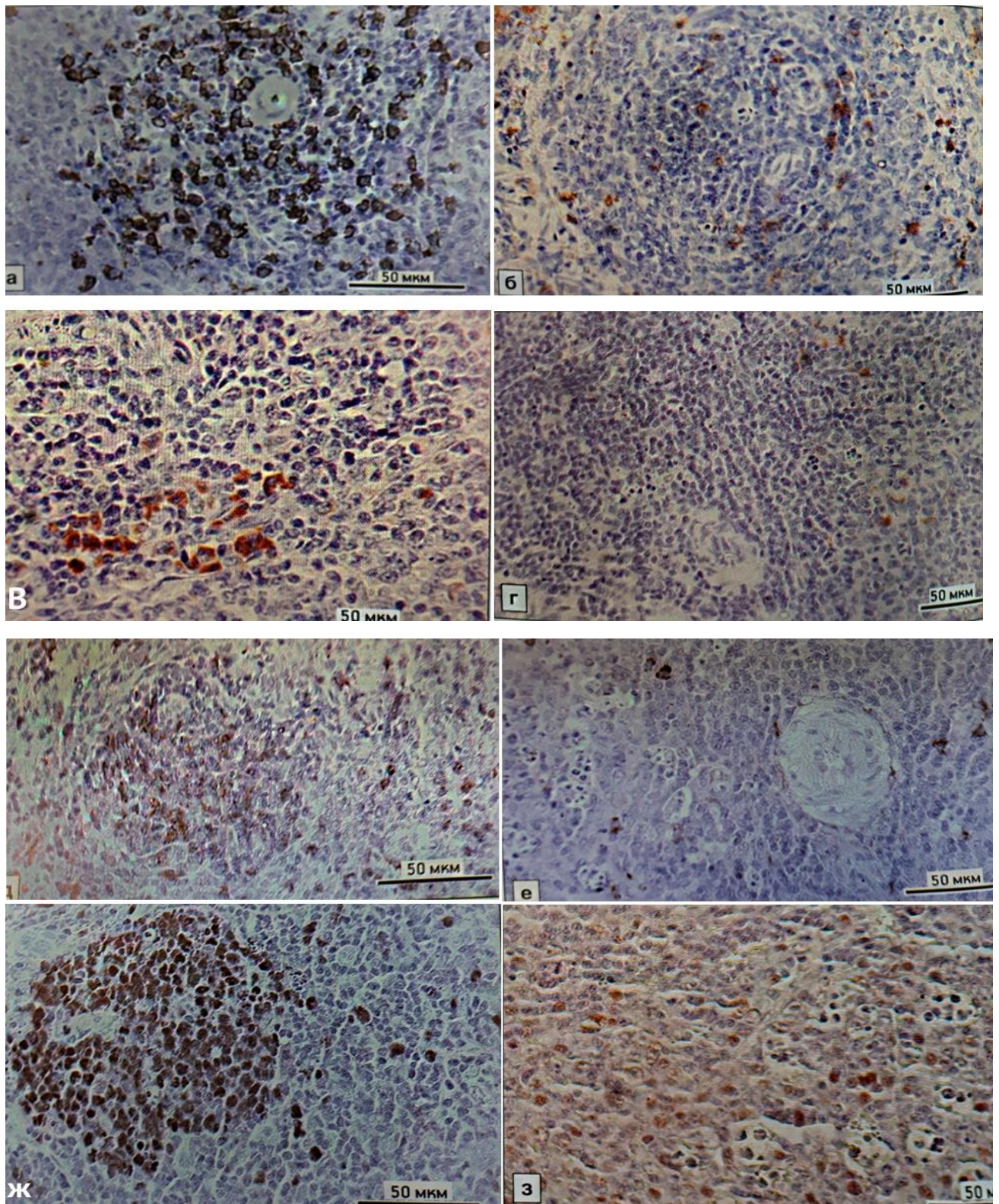


Рисунок 1. Изменения микроморфологической картины селезенки контрольных и экспериментальных животных после воздействия гомотипического и гетеротипического стресса.

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

При окрашивании на CD20 отмечалось яркое окрашивание и высокая плотность клеток в лимфоидных узелках, и несколько меньшая в маргинальной зоне. Гетеротипический стресс вызвал опустошение лимфоидных узелков селезенки из-за резкого снижения в них числа CD20-позитивных клеток; в меньшей степени изменения захватывали маргинальную зону селезенки, а также селезеночные тяжи у животных обеих возрастных подгрупп.

Окрашивание на белок S100 показало, что после стрессорного воздействия сеть стромальных клеток лимфоидных узелков селезенки, оказалась почти полностью разрушенной, особенно выраженными эти изменения были при воздействии гетеротипического стресса у животных исходного инфантильного возраста. Каспаза-3-иммунореактивные клетки содержались 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 доля иммунореактивных клеток в ПАЛВ умеренно уменьшилась в инфантильной группе и резко снизилась в перипубертатной экспериментальной группе. В лимфоидных узелках уменьшение доли иммунореактивных клеток ассоциировалось с их разрушением до полного исчезновения.

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 доли 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)

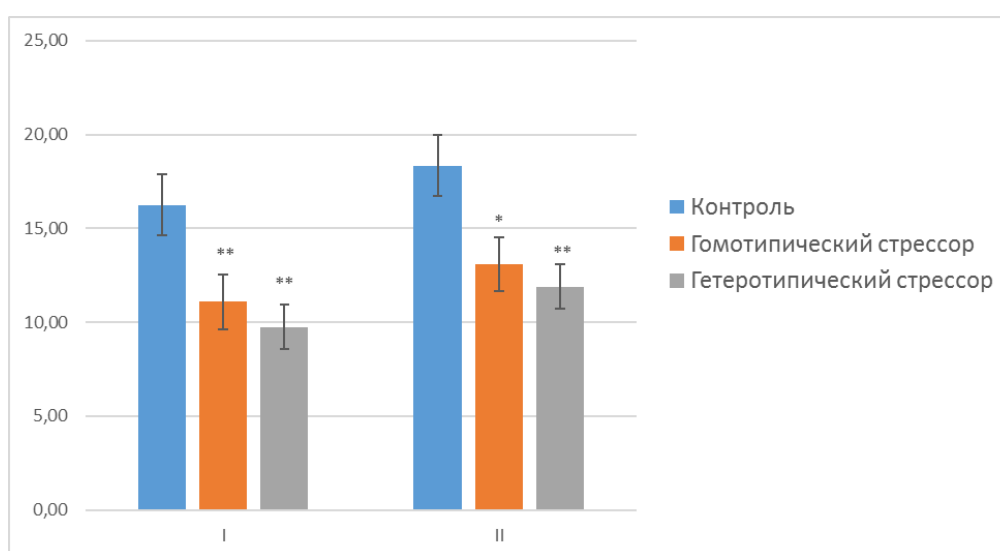


Рисунок 2. Удельная площадь CD4+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

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, занимаемая CD8+иммунореактивными клетками 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).

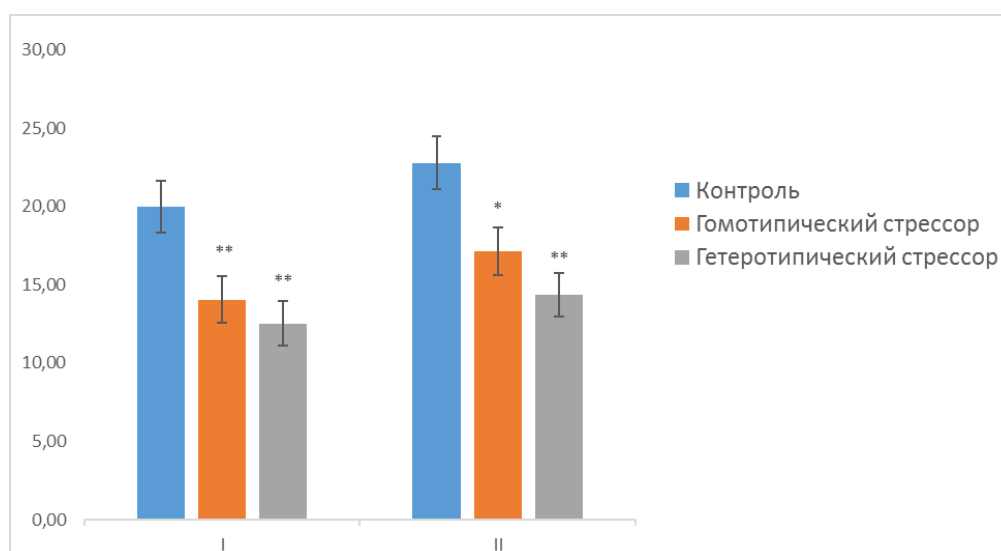


Рисунок 3. Удельная площадь CD8+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

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).

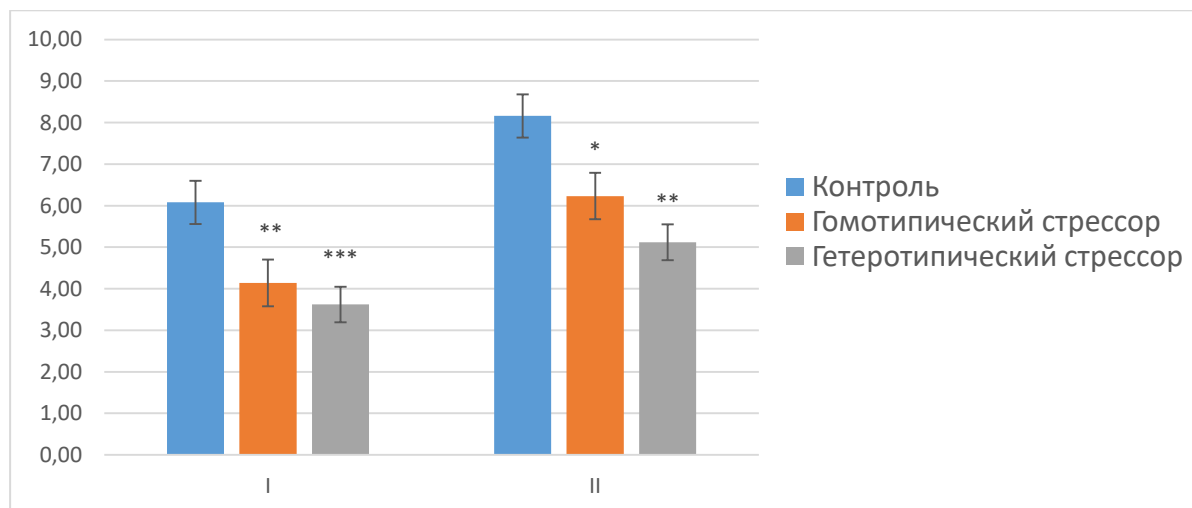


Рисунок 4. Удельная площадь CD90+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

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 гетеротипического стресса, 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).

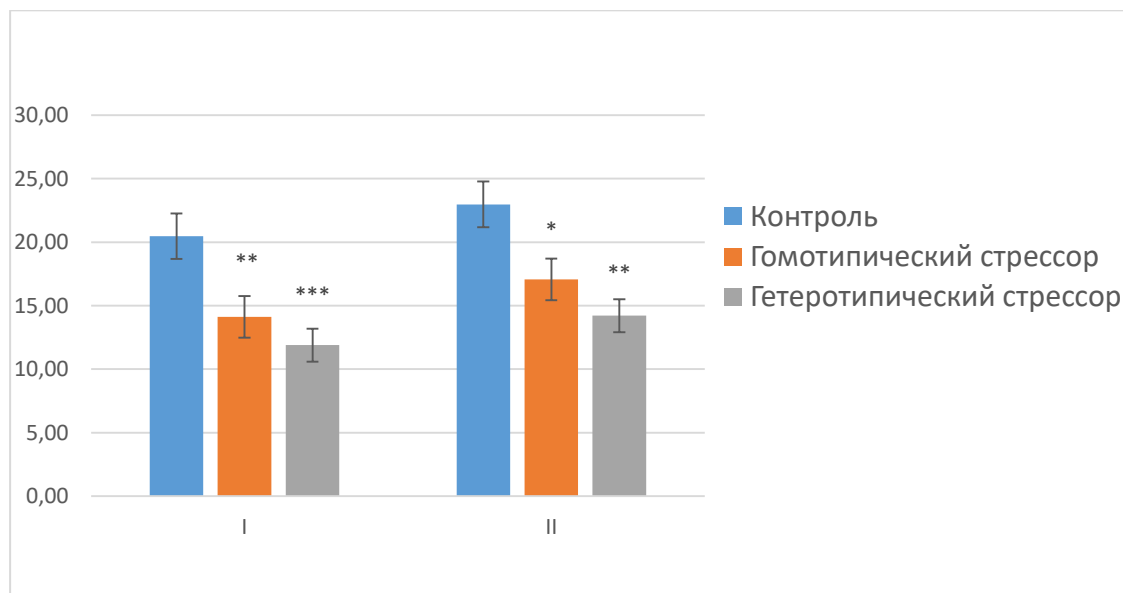


Рисунок 5. Удельная площадь CD20+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

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 инфантильного периода ($p < 0,01$) 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 гетеротипического стресса, 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.

Было изучено влияние стресса на возрастную динамику популяций стромальных клеток (рис. 6. 7).

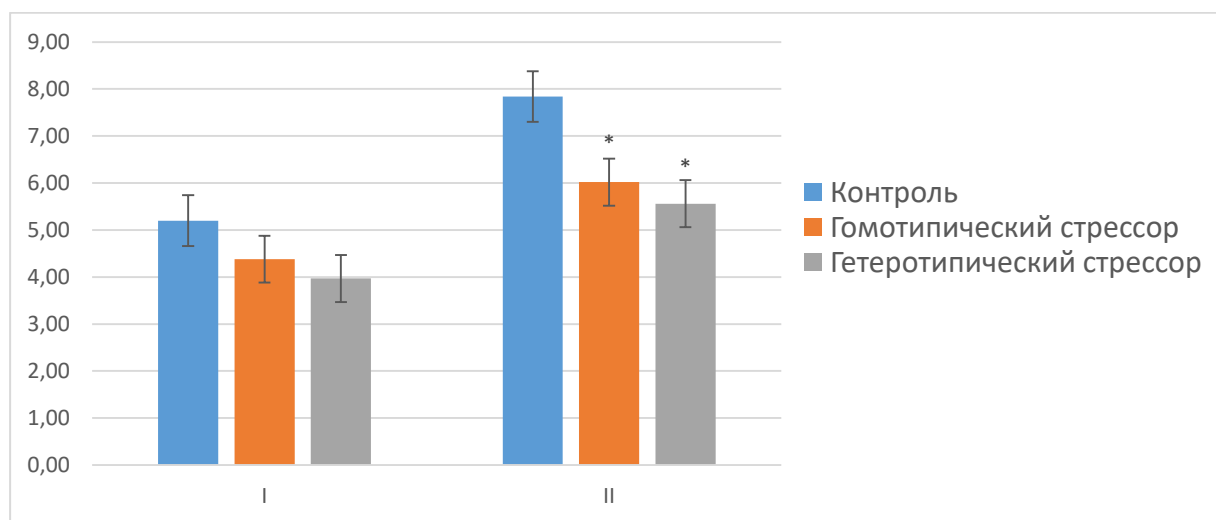


Рисунок 6. Удельная площадь OX62+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

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 стресса. Уменьшение удельной площади ОХ62+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 статистически значимо снижалось при действии обоих видов стрессоров с минимальными различиями между двумя стресс-группами.

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

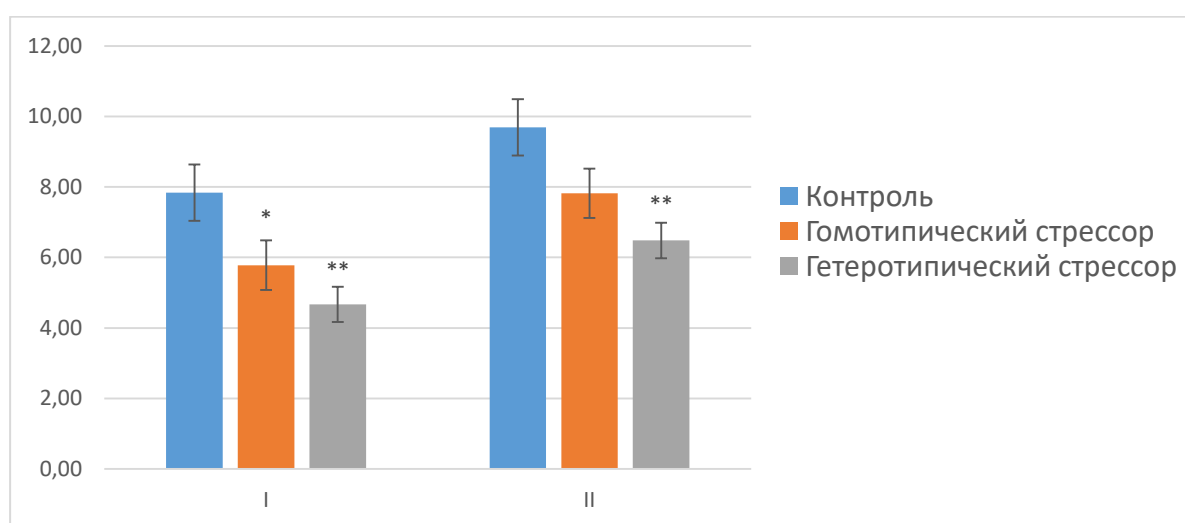


Рисунок 7. Удельная площадь s100+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_x$)

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 клеток проведен анализ содержания PCNA- и каспаза-3-иммунореактивных клеток (рис.8, 9).

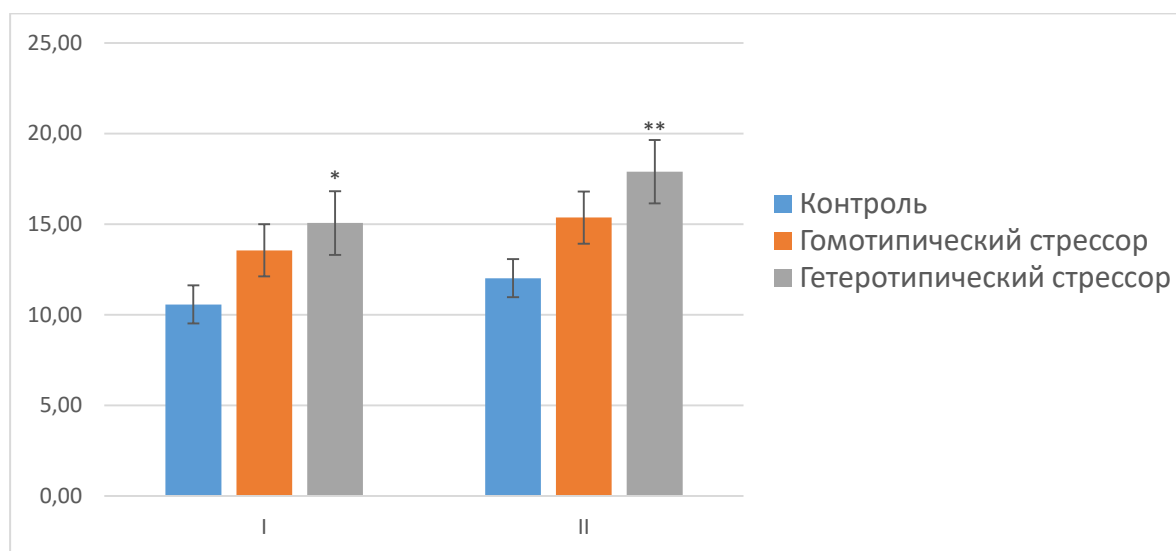


Рисунок 8. Удельная площадь каспаза-3+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

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 гомотипического стресса 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 стресса произошло статистически значимое 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 гомотипического стресса 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 стресса различия по сравнению с контрольной группой были еще более выраженными - удельная площадь PCNA+иммунореактивных клеток уменьшилась до $12.62 \pm 1.14\%$ ($p < 0,001$).

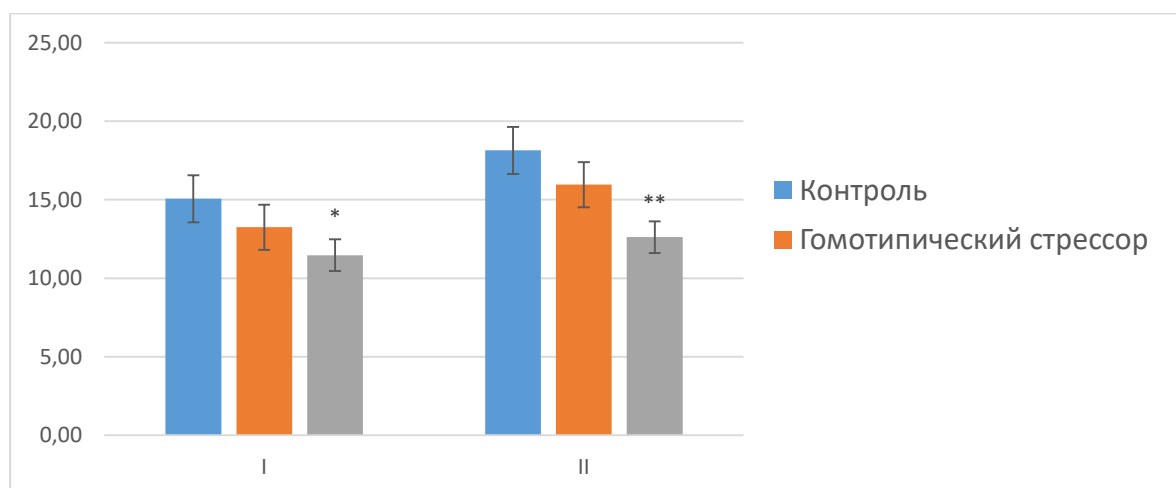


Рисунок 9. Удельная площадь PCNA+ иммунореактивных клеток в селезенке контрольных и экспериментальных животных ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

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 изменялась в обеих возрастных группах лишь при гетеротипическом стрессе, причем с большим уровнем значимости у перипубертатных животных.

Результаты проведенного исследования показали, что изменения, затрагивающие популяции лимфоидных и стромальных клеток в селезенке, а также интенсивность пролиферации и апоптоза иммуноцитов в различные периоды раннего постнатального онтогенеза при хроническом действии гетеротипического стресса, различаются и превосходят по значимости изменения, возникающие при гомотипическом стрессе. Диапазон этих различий связан с возрастными особенностями активации гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной оси при хроническом стрессе. Полученные данные демонстрируют, что 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 и формирует различные иммуномодуляторные изменения при гомо- и гетеротипическом стрессе на разных этапах раннего постнатального онтогенеза. Применение иммуногистохимических методов исследования и имидж-анализа позволяет выявить динамику стресс-ассоциированных изменений в селезенке у экспериментальных животных и продемонстрировать возрастные различия реакций на действие гомо- и гетеротипического стресса в двух возрастных группах у крыс.

Заключение. На основе результатов, полученных с использованием комплекса современных методов исследования (иммуногистохимических методов исследования и имидж-анализа) систематизированы представления о стресс-ассоциированных изменениях цитоархитектоники селезенки крыс инфантильного и перипубертатного возраста. Установлено, что хронический стресс, как гомо-, так и гетеротипический, оказывает иммуносупрессивное действие на иммуноморфологию селезенки крыс во все возрастные периоды раннего постнатального онтогенеза, но при воздействии хронического стресса в

инфантильном возрасте гипоплазия лимфоидной ткани селезенки выражена больше, чем в перипубертатном периоде, и усиливается при хроническом действии гетеротипического стресса.

Мы полагаем, что полученные данные могут использоваться при разработке адресных мер профилактики иммуносупрессивных нарушений в растущем организме, пережившем хроническое действие гомо- или гетеротипического стресса.

ВЫВОДЫ

1. Перенесенный в инфантильном и перипубертатном периодах онтогенеза хронический стресс вызывает изменения цитоархитектоники селезенки, выраженность которых определяется видом стрессоров и возрастом, на который приходится их воздействие.

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, а также усиление их апоптоза. 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 зон 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 значительно снижается при действии обоих видов стрессоров.

5. 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.

Практические рекомендации

Рекомендуется применение различных по природе стрессоров (гомо- и гетеротипических) в экспериментальных исследованиях 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 PCNA- и каспаза-3-иммунореактивных клеток.

Рекомендуется применение иммуногистохимических методов исследования для уточнения выраженности стресс-ассоциированных изменений в компартментах селезенки.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Особенности реакции иммунной и эндокринной систем растущего организма на воздействие хронического стресса / О.В. Федорова, О.Е. Верстакова, М. Аснизам, Т.А. Асари, Худа Салех, В.Л. Загребин, В.В. Хлебников, **Д.А. Чернов** // Материалы 63-ой итоговой научной конференции студентов и молодых ученых ВолГМУ, 26-29 апреля 2005 г., Волгоград, с.122-124.
2. Возрастные аспекты иммуномодуляционных изменений при хроническом стрессе / Н.А. Мураева, М.Ю. Капитонова, А.И. Краюшкин, В.В.

Хлебников, Д.А. Чернов, О.В. Федорова // Фундаментальные исследования, 2006, N5, С.64-65. ПИ №77-15598.

3. Соотношение иммуномодуляционных сдвигов в центральных и периферических органах иммунной защиты при хроническом стрессе / М.Ю. Капитонова, Н.А. Мураева, А.И. Краюшкин, В.В. Хлебников, Д.А. Чернов, Т.С. Смирнова, А.А. Нестерова // **Морфология.**- 2006- N5.- С.49-50.
4. Иммуногистохимическая характеристика стромальных элементов селезенки растущих крыс различных пород / В.В. Хлебников, Д.А. Чернов, Н.Г. Фомина, Л.И. Кондакова, М.С. Тарасова // В сб.: «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», апрель 2006, ВолГМУ, с.154.
5. Влияние хронического психо-эмоционального стресса на параметры врожденного иммунного ответа в раннем постнатальном онтогенезе / Н.А. Мураева, А.А. Нестерова, В.В. Хлебников, Д.А. Чернов, М.Ю. Капитонова // Фундаментальные исследования.- 2006.- N11.- С.51-52. ПИ №77-15598.
6. Возрастные особенности соотношения изменений иммунных параметров в центральных и периферических органах иммуногенеза при хроническом стрессе / М.Ю. Капитонова, Н.А. Мураева, Д.А. Чернов, В.В. Хлебников, А.А. Нестерова // Фундаментальные исследования.- 2006.- N11.- С.61-62. ПИ №77-15598.
7. Иммуногистохимическая характеристика стромальных элементов Т-зон периферических органов иммунной защиты в раннем постнатальном онтогенезе / А.И. Рябикина, Н.Г. Краюшкина, В.В. Хлебников, Д.А. Чернов Д.А., М.Ю. Капитонова, А.А. Нестерова // Успехи современного естествознания, 2008, №1, с.95-96. ПИ №77-11311.
8. Иммуногистохимическая характеристика селезенки при действии различных видов стрессоров / М.Ю. Капитонова, С.Л. Кузнецов, С.Б.С.А. Фуад, Ю.В. Дегтярь, В.В. Хлебников, А.А. Нестерова, Д.А. Чернов // **Морфология**, 2009, Т.136, N5, С.61-66.

9. Age specific stress-modulated changes of splenic immune-architecture in the growing body / M.Yu. Kapitonova, S.L. Kuznetsov, S.B.S.A Fuad, N. Shwe, A. Kyi, Yu.V. Khlebnikov, E. Pratama, E.M. Mikhailenko, **D.A. Chernov** // In: The Materials of the 24th Meeting of the Malaysian Society of Physiologists and Pharmacologists, Shah Alam, 2nd -3rd June, 2010, p.74.
10. The effect of the homo- and heterotypic stressors on the immunoarchitecture of the central and peripheral lymphoid organs / M.Yu. Kapitonova, S.L. Kuznetsov, M. Ullah, M.N.K Nor-Ashikin, S.B.S.A Fuad, N. Shwe, Yu.V. Khlebnikov, A.V. Kholodov, Fokina E.N., **D.A. Chernov** // Proceedings of the 6th APICA, Surabaya, Indonesia, July 22-23, 2011, p.309.
11. Влияние гомо- и гетеротипических стрессоров на иммуноморфологию лимфоидных органов / М.Ю. Капитонова, М. Улла, М.Н.Х. Нор Ашикин, Ю.В. Дегтярь, **Д.А. Чернов**, О.В. Федорова, И.Л. Демидович, Е.Н. Фокина, А.В. Холодов // **Морфология** 2011, т.140, N5, с.90-91.
12. Возрастные особенности изменений в белой пульпе селезенки при действии гетеротипических стрессоров: экспериментальное морфологическое исследование / М. Ю. Капитонова, С.Б. Фуад, С.Л. Кузнецов, С.С. Дыдыкин, **Д.А. Чернов**, М.Н.К. Нор-Ашикин', А. Ахмад // **Морфология**, 2017, Т.152, N4, С.40-44.