

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГРАНЗИМ Б-СОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ИММУННЫХ ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

М.Ю. Капитонова, А.И. Краюшкин, Н.А. Мураева, О.В. Федорова, А.А. Нестерова

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии;

кафедра анатомии человека ВолГМУ

В статье анализируется влияние хронического стресса на распределение NK-клеток в компартаментах селезенки и лимфатических узлов экспериментальных животных в различные возрастные периоды раннего постнатального онтогенеза. Показана динамика стресс-ассоциированных изменений иммунных параметров, относящихся к врожденному иммунитету.

Ключевые слова: хронический стресс, иммунитет врожденный, NK-клетки, гранзим Б, селезенка, лимфатические узлы, ранний постнатальный онтогенез.

AGE-RELATED DISTRIBUTION OF GRANZYME B-POSITIVE CELLS IN THE RAT PERIPHERAL IMMUNE ORGANS UNDER CHRONIC STRESS CONDITIONS

M.Yu. Kapitonova, A.I. Krayushkin, N.A. Muraeva, O.V. Fedorova, A.A. Nesterova

Abstract. Impact of the chronic stress on the NK cells distribution in the spleen and lymph node compartments of the experimental animals is under evaluation. Age-related dynamics of the stress-associated changes of the innate immune parameters is presented in the paper.

Key words: chronic stress, innate immunity, NK-cells, granzyme B, spleen, lymph nodes, early postnatal ontogenesis.

Стресс оказывает мощное воздействие на иммунный статус организма, влияя на разные звенья иммунного ответа, однако, несмотря на многочисленность исследований в области нейроиммуноэндокринологии в последние годы, до сих пор единого понимания характера и направленности стресс-ассоциированных иммуномодуляторных сдвигов не достигнуто [1, 2]. Сохраняются противоречия в интерпретации результатов воздействия разных видов стресса на врожденный иммунитет. Так, одни исследователи показывают, что острый стресс стимулирует врожденный иммунный ответ, влияя на активность нейтрофилов, макрофагов и NK-клеток, а хронический стресс оказывает дифференцированное действие на разные звенья иммунного ответа: тормозящее – на нейтрофилы и активирующее – на NK-клетки [10]. Другие исследователи демонстрируют снижение активности NK-клеток и их числа, а также антиген-презентирующей способности моноцитов в селезенке, что связывают с повышенным уровнем кортикостероидов [4, 17]. В противоположность этому другими авторами показано увеличение числа NK-клеток в селезенке при стрессе [6] с одновременным снижением их активности [12]. Вопреки всему этому было продемонстрировано, что количество NK-клеток в селезенке при остром иммобилизационном стрессе не меняется, несмотря на то,

что они содержат рецепторы и к глюкокортикоидам, и к опиоидам, уровень которых при действии стрессоров значительно возрастает, и реагируют на стимуляцию симпатической нервной системы, активируемой при стрессе [7].

NK-клетки являются основным компонентом врожденного иммунитета, однако они регулируют и адаптационный иммунный ответ. Они осуществляют ранний контроль репликации вируса с помощью перфорин-опосредованного механизма, имеют возможность мигрировать в очаг инфекции и гибнуть апоптозом вскоре после инфицирования. Главная функция NK-клеток – это секреция цитокинов и прямая цитотоксичность. Гранулы цитоплазмы активированных NK-клеток и цитотоксических лимфоцитов содержат порообразующий белок перфорин и несколько гомологичных серин-протеаз (гранзимов) [8]. Данные о влиянии стресса на иммунный ответ растущего организма в литературе единичны и выполнены в основном с применением иммунологических методов исследования, не позволяющих оценить иммуномодуляторные изменения с учетом компартиментализации иммунных органов [7, 9, 18].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние хронического стресса на динамику гранзим Б-содержащих клеток, связанных с естественным иммуногенезом, в компар-

тментах селезенки растущих экспериментальных животных.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовано 36 экспериментальных животных – белых крыс породы Sprague Dawley трех возрастных групп: грудного, подсосного и инфантного периодов (14, 21 и 30 дней от роду соответственно) по 12 животных в группе. Каждая возрастная группа подразделялась на 2 подгруппы: экспериментальную и контрольную по 6 животных в подгруппе. Экспериментальные животные подвергались действию хронического иммерсионно-иммобилизационного стресса [16] на протяжении 7 дней по 5 часов ежедневно. По окончании последнего сеанса стресса животных забивали под эфирным наркозом, извлекали, взвешивали и фиксировали формалином органы иммунной и эндокринной систем (селезенку, тимус, надпочечники), макроскопически оценивали также состояние слизистой оболочки желудка. Парафиновые срезы органов окрашивали гематоксилином и эозином. Дополнительно серийные срезы селезенки окрашивали иммуногистохимически мышинными противокрысиными антителами к CD3 (clone 1F4, "Serotec"), мышинными противокрысиными антителами к CD8 (клон MRC OX8, "Serotec"), мышинными антителами к гранзиму Б (клон GB7, "Serotec"). Распределение гранзим Б-иммунореактивных клеток оценивали с помощью имидж-анализа с применением программы "Image Pro+" (микроскоп "NIKON Eclipse E200", камера "Nikon Coolpix 995", Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что у всех экспериментальных животных трех возрастных групп отмечают: акцидентальная инволюция тимуса и селезенки, гипертрофия надпочечников и эрозивные повреждения слизистой оболочки желудка. Микроскопически в селезенке выявлены характерные для хронического стресса инволютивные изменения, проявляющиеся в гипоплазии белой пульпы: уменьшении ее объема, снижении числа лимфоидных узелков, практически полном исчезновении герминативных центров, сужении внутренней и наружной зоны периартериальных лимфоидных влагаллищ (ПАЛВ), увеличении частоты апоптозов лимфоидных клеток не только в лимфоидных узелках, но и ПАЛВ, сужении маргинальной зоны (рис. 1). В лимфатических узлах экспериментальных животных отмечалось сужение коркового вещества и паракортикальной зоны, уменьшение их клеточности, уменьшение числа и деформация лимфоидных узелков и герминативных центров (последнее справедливо для старшей возрастной группы), увеличение числа апоптозов как в лимфоидных фолликулах, так и в паракортикальной зоне (рис. 2).

CD8+ иммунореактивные клетки присутствовали у контрольных животных всех возрастных групп преимущественно в ПАЛВ селезенки и паракортикальной зоне лимфатических узлов (рис. 3, 4). Известно, что данный маркер экспрессируют не только цитолитические лимфоциты, двойные позитивные лимфоциты, но и примерно половина NK-клеток [13], хотя последние, в отличие от цитотоксических лимфоцитов, не экспрессируют Т-клеточный маркер CD3+ [3, 5,]. Гранзим Б-позитивные клетки у контрольных животных присутствовали как в красной и белой пульпе, так и маргинальной зоне селезенки (рис. 5, 6). В лимфатических узлах контрольных животных их число было чрезвычайно мало. Стресс значительно изменял количество и распределение гранзим Б-позитивных клеток в селезенке, и это изменение имело свою специфику в различных возрастных группах (рис. 7, 8).

Так, в младшей возрастной группе гранзим В-клетки практически полностью исчезали из маргинальной зоны и белой пульпы, однако сохранялись мелкими конгломератами или рассеянными в красной пульпе. В средней возрастной группе в маргинальной зоне иммунореактивные клетки также практически отсутствовали, однако единичные клетки сохранялись в белой пульпе – в крупных ПАЛВ, а именно в наружной их зоне на границе с маргинальной зоной. В красной пульпе число гранзим Б-позитивных клеток также заметно снижалось. В старшей возрастной группе уменьшение числа иммунореактивных клеток не столь выражено, как в младшей и средней группах. Сохранялись единичные гранзим Б-позитивные клетки в маргинальной зоне, в крупных и средних ПАЛВ, в то время как в красной пульпе число их уменьшалось незначительно по сравнению с контролем. При этом и у экспериментальных, и у контрольных животных всех возрастных групп число CD8+ и CD3+ клеток было в несколько раз ниже, чем число иммуногистохимически выявляемых гранзим Б-позитивных клеток.

Имидж-анализ в основном подтвердил данные, обнаруженные на качественном уровне, дополнив их некоторыми подробностями. Так, удельная площадь гранзим Б-иммунореактивных клеток у контрольных животных была 4,8+/-0,51, 4,6+/-0,43 и 5,4+/-0,55 % в младшей, средней и старшей группах соответственно. У экспериментальных животных всех возрастных групп имело место снижение удельной площади иммунореактивных клеток до 3,1+/-0,30 % у животных грудного возраста ($p < 0,01$), до 2,9+/-0,27 % у животных в период перехода на самостоятельное питание ($p < 0,001$) и до 4,0+/-0,38 % у перипульпальных особей ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенное количественное иммуногистохимическое исследование показало наличие в селезенке крыс всех трех изученных возрастных групп наличие иммуносупрес-

в периферических иммунных органах. Эти клетки выявлялись гистохимически с помощью моноклональных антител против гранзима Б-содержимого гранул этих клеток. Помимо НК-клеток, гранзимы (серин-протеазы) содержатся в цитолитических Т-лимфоцитах (ЦТЛ), которые экспрессируют маркеры CD8+ и CD3+. Считается, что примерно половина НК-клеток также экспрессирует маркер CD8+ [13], однако наше исследование показало, что доля гранзим Б-положительных клеток в селезенке крыс всех изученных возрастных групп значительно ниже, чем доля CD8+ и CD3+клеток; кроме того, из литературных данных известно, что у крыс в селезенке в отсутствие антигенной стимуляции ЦТЛ чрезвычайно малочисленны, и гранзим Б+ клетки – это, в основном, НК-клетки [3, 5].

Проведенное исследование показало, что наиболее значительное снижение число НК-клеток отмечается в период перехода на самостоятельное питание. Известно, что НК-клетки проявляют цитотоксичность по отношению, прежде всего, к инфицированным вирусами и опухолевым клеткам, следовательно, именно в данные возрастные периоды опасность стресс-ассоциированного снижения противовирусного и противоопухолевого иммунитета особенно велика. При этом, прежде всего, хронический стресс вызывает содержание иммуногистохимически выявляемых НК-клеток в маргинальной зоне, в которой при развитии вирусной инфекции появляются первые инфицированные клетки [3, 5].

Полученные нами данные противоречат данным других исследователей относительно увеличения экспрессии гранзима Б, доли и активности НК-клеток при стрессе [6, 9, 10, 12] или относительно не зависящего от стресса количества НК-клеток периферических иммунных органах [7], что может быть связано в различными методическими подходами, видами стресса и возрастом экспериментальных животных. Выделяют несколько механизмов снижения НК-клеточности в селезенке при стрессе: избыточная гибель и измененный траффик клеток под действием стресс-индуцированного повышения концентрации глюкокортикоидов, опиоидов и адренергической стимуляции (в связи с чем примене-

ние антагонистов-рецепторов к кортикостероидам и опиоидам, а также β-адреноблокаторов способно восстановить сниженную цитотоксичность и численность НК-клеток) [11, 14, 18, 19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные о возрастной динамике параметров врожденного иммунного ответа могут быть учтены при разработке лечебных тактик, предотвращающих развитие стресс-ассоциированной иммуносупрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар, 2000. – 184 с.
2. Тендичник М.В., Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В. и др. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 12. – С. 1522–1529.
3. Amsen D., Blander J.M., Lee G.R., et al. // Cell. – 2004. – Vol. 117. – № 4. – P. 515–526.
4. Dhabhar F.S., McEwen B.S. // J. Immunol. – 1996. – Vol. 156. – № 7. – P. 2608–2615.
5. Dokun A.O., Chu D.T., Yang L., et al. // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167, № 9. – P. 5286–5293.
6. Goebel M.U., Mills P.J. // Psychosom. Med. – 200. – Vol. 62. – N5. – P. 664–670.
7. Kanemi O., Zhang X., Sakamoto Y., et al. // Clin. Exp. Immunol. – 2005. – Vol. 139, № 1. – P. 25–34.
8. Kummer J.A., Kamp A.M., Tadema T.M., et al. // Clin. Exp. Immunol. – 1995. – Vol. 100, № 1. – P. 164–172.
9. Nieman D.C., Pedersen B.K. // Sports Med. – 1999. – Vol. 27, № 2. – P. 73–80.
10. Nunez M.J., Balboa J., Rodrigo E., et al. // Neurosci. Lett. – 2006. – Vol. 396, № 3. – P. 247–251.
11. Oya H., Kawamura T., Shimizu T., et al. // Clin. Exp. Immunol. – 2000. – Vol. 121, № 2. – P. 384–390.
12. Parslow T.G., Stites D.P., Terr A.I., et al. / Ed. by T.G. Parslow. – N.-Y.: Lange Medical Books, 2001. – 814 p.
13. Sheridan J.F., Dobbs C., Jung J., et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1998. – Vol. 840. – P. 803–808.
14. Stefanski V., Engler H. // J. Neuroimmunol. – 1999. – Vol. 94, № 1–2. – P. 144–152.
15. Takagi K., Kasuya Y., Watanabe K. // Chem. Pharm. Bull. – 1964. – Vol. 12. – P. 465–472.
16. Toft P., Dagnaes-Hansen F., Tonnesen E., et al. // Acta Anaesthesiol. Scand. – 2002. – Vol. 46, № 4. – P. 405–410.
17. Tseng R.J., Padgett D.A., Dhabhar F.S., et al. // Brain Behav. Immun. – 2005. – Vol. 19, № 2. – P. 153–164.
18. Xia X., Pan Y., Zhang W.Y., et al. // Biol. Pharm. Bull. – 2006. – Vol. 29, № 5. – P. 938–944.