

© Топол И.А., Камышный А.М., 2014

УДК: 616.34-018-092-02: [57.048+579.61]] – 092.9

## ИЗМЕНЕНИЯ БАЛАНСА СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ В КАЛТ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЗООСОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА И МОДУЛЯЦИИ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ

*И.А. Топол, А.М. Камышный*

Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Исследовано влияние хронического зоосоциального стресса (ХЗС) и модуляции состава кишечной микрофлоры на соотношения субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ. Установлено, что развитие ХЗС сопровождается дисбалансом Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup>- и Foxp3<sup>+</sup>/Rorγt<sup>+</sup>-клеток, свидетельствуя о доминировании Th1- и Th17-дифференцировки и повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике. Показано, что введение канамицина стрессированным животным приводит к доминированию Th1- и Treg-субпопуляций, а модуляция кишечной микрофлоры лактобактерином снижает соотношения Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup>-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок, увеличивает в субэпителиальной зоне и односторонне повышает коэффициент Treg/Th17.

**Ключевые слова:** стресс, КАЛТ, Т-хелперы, Treg.

Современная ситуация в украинском обществе характеризуется высоким уровнем социального напряжения, что провоцирует развитие стресса, тревоги и депрессии. В свою очередь, стрессиндуцированная иммунная дисрегуляция приводит к значительным негативным последствиям для здоровья, увеличивая риск развития вирусных инфекций, хронических аутоиммунных и воспалительных заболеваний [12]. Так, во многих клинических и экспериментальных исследованиях было показано, что хронический социальный стресс (ХСС) может быть триггером развития многих патологических состояний, включая сахарный диабет 1 типа (СД 1 типа) и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), в механизмах развития которых, в свою очередь, важную роль играют нарушения дифференцировки различных субпопуляций Т – хелперов, в частности, дисбаланс Th1/Th2 и Treg/Th17-клеток в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани

(КАЛТ) [10]. Ключевыми регуляторами образования Th1 и Th2 являются транскрипционные факторы T-bet и GATA-3, нокаут по генам которых (*TBX21* и *GATA3*) блокирует развитие соответствующих лимфоцитов [13, 14]. Дифференцировка Th17 и Т-регуляторных клеток, в свою очередь, зависит от экспрессии транскрипционных факторов RORγt и Foxp3. Экспериментальная трансдукция Foxp3 внерегуляторные Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> "наивные" Т-клетки человека или мышей придает последним функциональные свойства и фенотип Treg [2], а нокаут гена *RORγt* приводит к потере способности CD4<sup>+</sup>Т – клеток дифференцироваться в Th17-клетки; их способность к выработке IL-17 резко ослабевает [9]. У мышей с такой патологией невозможно индуцировать аутоиммунные процессы [9]. Характерно, что именно тонкий кишечник, особенно подвздошная кишка, является основным местом генерации индуцибельных Treg – клеток (iTreg) и резервуаром

пула Th17-клеток, так как именно здесь происходит индукция их дифференцировки из наивных Т-лимфоцитов с участием кишечной микрофлоры [6].

Учитывая это, целью нашей работы было выявить особенности соотношения Th1/Th2 и Treg/Th17-лимфоцитов в КАЛТ крыс в условиях ХЗС и модуляции состава кишечной микрофлоры.

#### Материалы и методы

Исследования проводились на 70 самках крыс линии Wistar, которые были разделены на семь экспериментальных групп: контрольные крысы, которым интрагастрально (и/г) в течение 3-х недель вводили по 0,5 мл физиологического раствора (группа 1); крысы, которым моделировали ХЗС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (ПЭВ), предполагавший перманентное проживание самок в «агрессивной среде», а именно, через перфорированную перегородку в клетке с агрессивным самцом, который ежедневно вступал в конфронтации с подсаженным к нему другим самцом (группа 2); крысы, которым моделировали ХЗС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках (20 крыс на клетку) в течение 3 недель с ежедневной сменой группировки, при котором подопытную самку каждый день помещали в новую сбалансированную и перенаселенную колонию (группа 3); крысы с ХЗС1 и ХЗС2, которым осуществляли модуляцию состава кишечной микрофлоры путем внутрижелудочного (и/г) введения аминогликозидного антибиотика канамицина (*Can*) в течение 7 суток ежедневно, начиная с 3-й недели моделирования ХЗС в дозе 15 мг/кг (группы 4 и 5, соответственно); крысы с ХЗС1 и ХЗС2, которым осуществляли модуляцию состава кишечной микрофлоры путем и/г ежедневных введений *Лактобактерина* (*Lb*, смесь живых лиофильно высушенных лактобактерий *L. plantarum* штамм 8P – А3 и *L. fermentum* штамм 90Т – С4) в течение 3-х недель в дозе  $4 \cdot 10^8$  КОЕ (группы 6 и 7, соответственно). Уровень эмоционально – поведенческой и исследовательской активности изучали в тестах «открытое по-

ле» и «перегородка»; в тесте Порсолта («принудительного плавания», ПП) определяли уровень депрессивности животных. Крыс выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом.

Структуру популяции T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- и Foxp3<sup>+</sup>-клеток изучали на основании анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы подвздошной кишки. Данные срезы депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1М фосфатном буфере (pH=7,4) и красили с первичными кроличьими поликлональными антителами (ПКАТ) к транскрипционным факторам T-bet, GATA3, RORγt и Foxp3 крысы (Santa Cruz Biotechnology, США) в течение 18 часов во влажной камере при T=4°C. После отмывания избытка первичных антител в 0,1М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут (T=37°C) с вторичными антителами к полной молекуле IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации срезы промывали 0,1М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (НИН, США). Изображение, получаемое на микроскопе PrimoStar (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры AxioCam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводилось в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флюоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих T-bet, GATA3, RORγt и Foxp3.

Рассчитывались морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток. При окраске МКАТ исследовали T-bet<sup>+</sup>, GATA3<sup>+</sup>, RORγt<sup>+</sup> и Foxp3<sup>+</sup> – лимфоциты, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки заполненных лимфоцитами ворсинок (Lymphocyte-filled villi, LFV, ЗЛВ), являющиеся отдельным компартментом КАЛТ у крыс и в субэпителиальной зоне сгруппированных лимфоидных узелков (СЭЗ, PPSubep). Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ EXCEL из пакета MS Office 2010 (MicrosoftCorp.США), STATISTICA 6.0 (Stat – Soft, 2001).

#### Результаты и обсуждение

Известно, что у животных в условиях длительного ПЭВ или зоосоциальной изоляции формируется патологическое состояние, которое характеризуется выраженной тревожностью, снижением исследовательской и двигательной активности, коммуникативности и болевой чувствительности, нарушениями эстрального цикла, полового/социального распознавания, развитием депрессивности [1]. Кроме того, у таких животных наблюдается весь спектр свойственных стрессу реактивных изменений, а имен-

но, увеличение массы надпочечников, уровня адреналина и норадреналина, высвобождение кортикостерона и др. [1]. Результаты проведенного нами тестирования экспериментальных животных в тесте "Открытое поле" показали, что развитие ХЗС приводило к достоверному снижению основных показателей двигательной-исследовательской и эмоциональной активности: горизонтальной двигательной активности (на 25%, p<0,05 (ХЗС1) и 29%, p<0,05 (ХЗС2)), вертикальной двигательной активности (на 38%, p<0,05 (ХЗС1) и 47%, p<0,05 (ХЗС2)) и исследовательской активности (на 41%, p<0,05 при ХЗС1 и на 54%, p<0,05 в случае ХЗС2). Полученные результаты свидетельствовали о проявлении выраженной тревожности у крыс в условиях хронического зоосоциального стресса (табл. 1). Кроме того, ХЗС приводил к достоверному усилению груминга (на 75%, p<0,05 при ХЗС1 и на 92%, p<0,05 в случае ХЗС2) и актов дефекации (болосы) (в 3,6 раз, p<0,05 при ХЗС1 и в 2,8 раз, p<0,05 в случае ХЗС2) по сравнению с контрольной группой крыс (табл. 1). Следует указать, что снижение двигательной активности крыс на фоне заметно возросшего груминга, по мнению ряда исследователей [8] свидетельствует о развитии стресса и тревожно-депрессивных изменений поведения.

Таблица 1

#### Результаты поведенческих тестов крыс, подвергнутых ХСС

Серии	контроль	ХСС 1	ХСС 2
Тест «Открытое поле»			
ГДА	62,9±3,6	47,0±5,2 <sup>1</sup>	44,5±3,6 <sup>1</sup>
ВДА: climbing	12,5±0,8	7,8±1,1 <sup>1</sup>	6,6±0,8 <sup>1</sup>
rearing	4,8±0,7	2,4±0,3	4,5±0,7
Груминг: короткий	1,2±0,2	2,1±0,3 <sup>1</sup>	2,3±0,3 <sup>1</sup>
длительный	1,0±0,2	0,9±0,1	0,8±0,1
Обследование отверстий	6,8±0,4	4,0±0,3 <sup>1</sup>	3,1±0,3 <sup>1</sup>
Уровень дефекации	0,5±0,3	1,8±0,4 <sup>1</sup>	1,4±0,2 <sup>1</sup>
Тест «Принудительное плавание»			
Активное плавание, сек.	121,6±9,3	73,5±11,2 <sup>1</sup>	70,2±8,5 <sup>1</sup>
Пассивное плавание, сек.	42±16,3	56±16,1	48,3±8,6
Иммобилизация, сек.	136,4±10,2	170,5±8,5 <sup>1</sup>	179,5±8,7 <sup>1</sup>
Тест «Перегородка»			
Число подходов к перегородке, к-во	5,4±0,8	2,1±0,2 <sup>1</sup>	2,6±0,3 <sup>1</sup>
Длительность нахождения, сек	53,9±6,4	33,9±3,7 <sup>1</sup>	37,3±5,2 <sup>1</sup>
Обнюхивание, к-во	5,7±0,7	5,3±1,1	4,3±0,8
Вставание на задние лапки, к-во	3,8±0,5	4,2±1,0	4,7±0,8
Груминг	3,1±0,4	2,6±0,3	2±0,4
Фризинг (замирание)	0,1±0,1	0,1±0,1	0,5±0,1 <sup>1</sup>

Примечание: – вероятность суждения об отсутствии различий средних величин по отношению к контролю p<0,05 (\*).

Хронический зоосоциальный стресс вызывал изменение поведения крыс и в тесте Порсолта на определение тревожности. Так, результаты тестирования экспериментальных животных в тесте ПП показали, что развитие ХЗС приводило к достоверному снижению длительности активного плавания (на 39%,  $p < 0,05$  при ХЗС1 и на 42%,  $p < 0,05$  в случае ХЗС2) и увеличению стадии иммобилизации (на 25%,  $p < 0,05$  в случае ХЗС1 и на 32%,  $p < 0,05$  при ХЗС2) по сравнению с контролем (табл. 1). Полученные результаты свидетельствовали о формировании депрессивного состояния у животных.

Результаты тестирования экспериментальных животных в тесте "Перегородка" также показали, что развитие ХЗС приводило к развитию повышенной тревожности у самок крыс, о чем свидетельствовало достоверное снижение числа подходов к перегородке (на 61%  $p < 0,05$  при ХЗС1 и на 52%,  $p < 0,05$  в случае ХЗС2), среднего времени пребывания у перегородки (на 37%,  $p < 0,05$  при ХЗС1 и на 31%,  $p < 0,05$  в случае ХЗС2) по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Кроме того, было зафиксировано статистически значимое увеличение фризинга при ХЗС2 (в 5 раз,  $p < 0,05$ ). Следует отметить, по данным литературы, фризинг – это реакция проявления наиболее сильного стресса [5].

Изучения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов показало, что развитие ХЗС не влияло на соотношение  $Tbet^+/Gata3^+$ -клеток в ЗЛВ подвздошной кишки крыс и приводило к достоверному повышению данного коэффициента в СЭЗ (на 75% ( $p < 0,05$ ) при ХЗС1 и на 46% ( $p < 0,05$ ) в случае ХЗС2) по сравнению с контрольной группой животных (рис. 1А). Наряду с этим, при развитии ХЗС прослеживается общая тенденция к достоверному снижению соотношения  $Treg/Th17$ -лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс, наиболее выраженная в ЗЛВ. Так, коэффициент распределения  $Foxp3^+/Roryt^+$ -клеток уменьшился в ЗЛВ в 4,1 раза ( $p < 0,05$ ) в случае ХЗС1 и в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) при ХЗС2; в СЭЗ – на 39% ( $p < 0,05$ )

при ХЗС1 и в 3,8 раза ( $p < 0,05$ ) в случае ХЗС2, по сравнению с контролем (рис. 1D).

Данные изменения свидетельствуют о доминировании в условиях ХЗС  $Th1$ - и  $Th17$ -дифференцировки, что повышает уровень про-воспалительной сигнализации в кишечнике. Полученные нами результаты совпадают с данными Hong M. et al. (2013), которые свидетельствуют о том, что при развитии стресса и стресс-индуцированной депрессии в лимфоидных органах у мышей изменяется количество  $Th17$ -лимфоцитов, и нарушается баланс между  $Th17/Treg$ -клетками [7]. Также Schmidt D. et al. (2010) показали, что ХЗС приводит к активации иммунной системы, стимулирует дифференцировку про-воспалительных  $Th17$ - и  $Th1$ -клеток в периферических лимфатических узлах экспериментальных животных, снижает количество  $Treg$ -лимфоцитов и вызывает спонтанное развитие стресс-индуцированного колита [3].

Введения *Can* стрессированным животным приводили к достоверному увеличению соотношения  $Th1/Th2$ -лимфоцитов только в случае ХЗС1 (в ЗЛВ в 2,1 раза,  $p < 0,05$  и в СЭЗ на 37%,  $p < 0,05$ ) и не влияли на этот баланс при ХЗС2 (рис. 1В). При этом коэффициент распределения  $Foxp3^+/Roryt^+$ -клеток вырос в ЗЛВ в 2,9 раза ( $p < 0,05$ ) при ХЗС1 и в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ) в случае ХЗС2, в СЭЗ – на 61% ( $p < 0,05$ ) только в случае ХЗС2 (рис. 1Е). Таким образом, несмотря на доминирование  $Th1$ -субпопуляции после введения *Can* стрессированным животным наблюдается и одновременное относительное увеличение числа Т-регуляторных клеток, способных нивелировать их эффекторные функции.

При введении *Lb* экспериментальным животным изменения в соотношении  $Tbet^+/Gata3^+$ -лимфоцитов носили разнонаправленный характер –  $Th1/Th2$  баланс снижался в ЗЛВ (на 18% ( $p < 0,05$ ) при ХЗС1 и на 29% ( $p < 0,05$ ) в случае ХЗС2) и повышался в СЭЗ (на 29% ( $p < 0,05$ ) при ХЗС1 и на 24% ( $p < 0,05$ ) в случае ХЗС2) (рис. 1С). В тоже время, соотношение

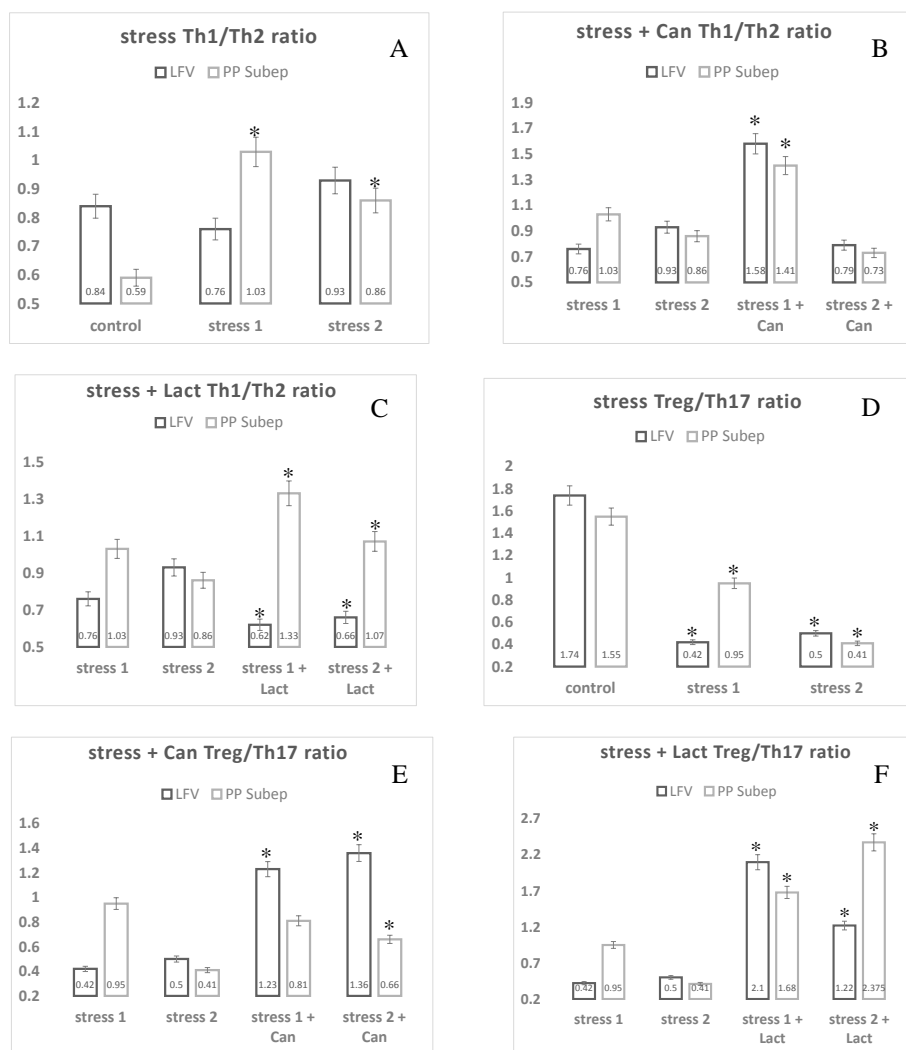


Рис. 1. Соотношение T-bet<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>-лимфоцитов (Th1/Th2) и Foxp3<sup>+</sup>/Roryt<sup>+</sup>-лимфоцитов (Treg/Th17) в ЗЛВ (LFV) и СЭЗ (PPSubep),\* – p<0,05

Foxp3<sup>+</sup>/Roryt<sup>+</sup>-клеток после введения пробиотика стрессированным крысам однонаправленно увеличивалось во всех изученных нами морфофункциональных зонах, наиболее интенсивно – в ЗЛВ. Так, коэффициент распределения Treg/Th17-лимфоцитов увеличился в ЗЛВ в 5 раз (p<0,05) при ХЗС1 и в 2,4 раза (p<0,05) в случае ХЗС2; в СЭЗ – на 77% (p<0,05) при ХЗС1 и в 5,8 раз (p<0,05) в случае ХЗС2 (Рис.1F). Полученные результаты совпадают с рядом исследований, продемонстрировавших способность *Lb* увели-

чивать количество Treg-клеток и, таким образом, предотвращать развитие воспалительных и АИЗ, а также уменьшать состояние депрессии и тревоги в условиях стресса [4]. Повышая уровень Treg, *Lb* оказывает антидиабетогенное действие в условиях стрептозотонин – индуцированного диабета и у BB-DP крыс путем индукции CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-клеток, уменьшает риск развития болезни Крона и язвенного колита [11]. Вместе с тем, Chiba Y. Et al. (2010) продемонстрировали, что *Lactobacillus casei* увеличивают продук-

цию IL-12 клетками селезенки и ПБ мышцей даже сильнее, чем некоторые патогенные бактерии, что, в свою очередь, стимулирует образование Th1 – клеток и продукцию про-воспалительного IFN $\gamma$  [15]. Способность *Lb* увеличивать соотношение Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup>-лимфоцитов в СЭЗ была обнаружена и нами.

#### Выводы

1. Развитие хронического зоосоциального стресса сопровождается дисбалансом субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ, приводя к увеличению соотношения Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup> и снижению Foxp3<sup>+</sup>/Roryt<sup>+</sup>-клеток, свидетельствуя о доминировании в условиях хронического зоосоциального стресса Th1- и Th17-дифференцировки и повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике.

2. Введение канамицина стрессированным животным приводит к доминированию Th1- и Treg-субпопуляций, а модуляция кишечной микрофлоры лактобактерином снижает соотношения Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup>-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок, увеличивает в субэпителиальной зоне и однонаправленно повышает коэффициент Treg/Th17.

#### Литература

1. Avgustinovich D. Gender-related characteristics of responding to prolonged psychoemotional stress in mice / D. Avgustinovich, I. Kovalenko // *Neurosc. Behav. Physiol.* – 2009. – Vol. 40, № 3. – P. 858-867.
2. Caton A. Regulatory cells in health and disease / A. Caton, K. Weissler // *Immunol Rev.* – 2014. – Vol. 259, №1. – P. 5-10.
3. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th17 cell responses / D. Schmidt [et al.] // *Brain Behav Immun.* – 2010. – Vol. 24, №7. – P. 1097-1104.
4. Cryan J. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior / J. Cryan, T. Dinan // *Nature Reviews Neuroscience.* – 2012. – Vol. 9. – P. 1-12.
5. Evaluation of an improved automated analysis of freezing behavior in rats and its use in trace fear conditioning / A.R. Marchand [et al.] // *J. Neurosci. Methods.* – 2003. – Vol. 126. – P. 145-153.
6. Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: An unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system / P. Schnupf [et al.] // *Semin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25. – P. 342-351.
7. Imbalance between Th17 and T-reg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice / M. Hong [et al.] // *Neuroimmunomodulation.* – 2013. – Vol. 20, №1. – P. 39-50.
8. Kaluyev A.V. Stress and grooming / A.V. Kaluyev. – М.: Aviks, 2002. – 146 p.
9. Littman D. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation / D. Littman, A. Rudensky // *Cell.* – 2010. – Vol. 140. – P. 845-858.
10. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis / S. Reber [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2011. – Vol. 25. – P. 1153-1161.
11. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice / H. Zhao [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 742-749.
12. Psychosocial stress and inflammation in cancer / N. Powell [et al.] // *Brain, Behavior and Immunity.* – 2013. – Vol. 30. – P. 41-47.
13. T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells / T. Hoyer [et al.] // *Curr Opin Immunol.* – 2013. – Vol. 25, № 2. – P. 139-147.
14. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity / V. Lazarevic [et al.] // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 777-789.
15. Well-controlled pro-inflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei* / Y. Chiba [et al.] // *Immunology.* – 2010. – Vol. 130, №3. – P. 352-362.

**CHANGES IN BALANCE OF T-HELPER SUBSETS  
IN THE GALT OF RATS UNDER CHRONIC ZOOSOCIAL STRESS  
AND MODULATION OF THE INTESTINAL MICROFLORA**

*I.A. Topol, A.M. Kamyshny*

**It was investigated the influence of chronic zoosocial stress (ZSS) and modulation of the intestinal microflora composition on the ratio of T-helper subsets in GALT.**

**It has been established that ZSS development was accompanied by an imbalance Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup>- and Foxp3<sup>+</sup>/Roryt<sup>+</sup>-cells, indicating the dominance of Th1- and Th17-differentiation and increasing levels of pro-inflammatory signaling in the gut.**

**It was shown that the introduction of kanamycin to the stressed rats leads to the dominance of Th1- and Treg subsets, but modulation of the intestinal microflora lactobacterine reduces the ratio of Tbet<sup>+</sup>/Gata3<sup>+</sup>- lymphocytes in the own lamina of mucous membrane of the fibres, increases in subepithelial zone and increases unidirectionally the ratio of Treg/Th17.**

*Keywords: stress, GALT, T-helper cells, Treg.*

Топол И.А. – ассист. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ.  
E-mail: innatopol@yandex.ua.

Камышный А.М. – д-р мед. наук, доц., зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ.