

УДК: 612.453.018

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ И ТИМУСА КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ХРОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Дойдоян Л.С.¹, Аракелян Г.Г.², Сароян М.Ю.¹, Худавердян Д.Н.¹, Торгомян А.Л.*

¹ЕГМУ, Кафедра физиологии

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, РФ

Получена: 06.07.2021, рецензирована: 24.08.2021, принята: 27.10.2021.

Ключевые слова: макрофаги, селезенка, тимус, стресс.

В современном мире из всего спектра негативных факторов воздействия на человеческий организм свое значимое место имеет стресс. Уже не встретишь человека, который периодически не подвергается вредному влиянию стресса. Одним из путей реализации разрушительного действия стресса являются изменения различных составляющих иммунитета человека.

В сложной структуре обеспечения защитных реакций организма при действии различных стрессорных агентов важнейшую роль играет система мононуклеарных фагоцитов, которая включается в защитный механизм на самых ранних стадиях его реализации. Исследование морфофункционального состояния системы мононуклеарных фагоцитов в нарушении иммунных механизмов защиты может являться ключевым в понимании причин повышения заболеваемости детского и взрослого населения экономически «неблагоприятных» стран.

Мононуклеарные фагоциты представляют собой большую, широко распространенную и морфологически гетерогенную группу клеток мезодермального происхождения. К этой группе клеток относятся моноциты периферической крови и тканевые макрофаги [5, 12].

Макрофаги – уникальные клетки человеческого организма. Они являются одним из важнейших звеньев в генерации и регуляции иммунного ответа, который осуществляется путем синтеза цитокинов и специфического взаимодействия макрофагов с лимфоцитами и фибробластами. С помощью синтеза и высвобождения

специфических цитокинов макрофаги контролируют систему комплемента, стимулируют рост лейкоцитов, активируют коагуляционный каскад, являются источником метаболитов арахидоновой кислоты [2, 6]. Тканевые макрофаги образуются из предшественников, находящихся в органах кроветворения: эмбриональном желточном мешке, печени, красном костном мозге и других гемопоэтических органах, таких как селезенка в постэмбриональном периоде [8]. Тканевые макрофаги традиционно описывались как «фиксированные», тем не менее, их дальнейшая миграция может быть активирована провоспалительными цитокинами. В ответ на воспаление и инфекцию моноциты, образованные в костном мозге, проходят в периферический кровоток и в дальнейшем проникают в окружающие ткани, где дифференцируются в макрофаги или дендритные клетки [9]. «Активированные» макрофаги часто демонстрируют повышенный метаболизм и экспрессируют рецепторы и лиганды для продуктов метаболизма активированных иммунных клеток. Образование, миграция, активация, старение и апоптоз макрофагов происходят под воздействием факторов роста, таких как M-CSF, GM-CSF и цитокинов, включая IL-4 / IL-13 и IL-6 [10].

В настоящее время под словом «стресс» понимают состояние организма, обусловленное действием на него чрезвычайных или патологических раздражителей (стрессоров) и приводящее к напряжению неспецифических механизмов защиты. Тем не менее, основоположник учения о стрессе Ганс Селье и его последователи считали, что факторы любой природы, дестабилизирующие гомеостаз, вызывают длительную ответную реакцию организма – стресс, а физиологический смысл этой реакции заключается в адаптации организма к стрессору [1]. Известно, что на стресс организм отвечает триадой симптомов: увеличением коркового слоя надпочечников и повышением его активности, редукцией тимуса и лимфатических узлов, появлением эрозий на слизистой оболочке желудоч-

* АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

А.Л. Торгомян

ЕГМУ, Кафедра физиологии

Адрес: ул.Корюна 2, 0025, Ереван

Эл. почта: adelinatorgomyan@yahoo.com

Тел.: (+374) 99 55 74 24

но-кишечного тракта, а адаптивная реакция организма при действии стрессора («общий адаптационный синдром» по Г. Селье) протекает в три стадии: тревоги, резистентности и истощения [1]. Механизмы адаптации взаимосвязаны сложным образом и имеют разнонаправленный характер в связи с возможностью перехода от защитных к разрушительным. Они становятся основой развития патологических процессов, которые зависят от количества, интенсивности и продолжительности действия стрессогенных факторов, а также особенностей организма, его предрасположенности к различным патологическим процессам. Стрессовая реакция становится неспецифической причиной многочисленных патологических состояний. Исследования иммунитета на клеточном уровне помогут пролить свет на важные биологические механизмы, лежащие в основе воздействия стресса на здоровье человека.

Целью нашего исследования является изучение морфологических и функциональных изменений в тканях селезенки и тимуса крыс, подвергнувшихся хроническому воздействию комбинированного стресса.

Задачами исследования являются определение количества макрофагов в тканях селезенки и тимуса крыс, подвергнутых действию хронического психоэмоционального стресса в сравнении с контрольной группой.

Материал и методы

Экспериментальное исследование было выполнено на 20 беспородных крысах-самцах (по 10 в каждой группе) массой 180-200 г до и после воздействия на них хронического психоэмоционального стресса. Животные находились в одинаковых условиях, на нормальном рационе питания и были задействованы в эксперимент после 1-2 недельной адаптации к условиям вивария. Моделирование психоэмоционального стрессового воздействия проводилось путем комбинирования двух экзогенных факторов: звукового и светового раздражителей. Параметры экспозиции: звук – мощностью 70 дБ, частотой 4 кГц, свет – частотой 13 Гц, длительностью воздействия 350 сек с интервалами между воздействиями в 15000 сек (6 экспозиций за сутки в течение всей беременности). Подобный выбор экспозиции объясняется тем, что комбинированное воздействие психоэмоционального стресса на организм, наиболее часто встречаемое в повседневной жизни, мало изучено. В последнее время именно шумовое и световое загрязнение окружающей среды является одним из ведущих отрицательных экологических факторов и

наиболее распространенной причиной жалоб населения многих стран. Поэтому сочетанное использование данных факторов у темнлюбивых грызунов следует рассматривать в качестве стрессовых.

Материалом для гистологического исследования являлись кусочки селезенки и тимуса. Для выявления макрофагов животным предварительно за 1 час до забоя был внутрибрюшинно введен раствор туши (2 мл туши + 2 мл физиологического раствора). Для световой микроскопии кусочки органов толщиной не более 0,5-1 см фиксировали в течение 24-х часов в 10% растворе формалина, промывали в проточной воде в течение 12 часов, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации (60-100°) и были залиты в парафин. Срезы были окрашены гематоксилин-эозином, что позволило выявить общую гистоструктуру исследуемых органов и клеточные элементы. Подсчет количества макрофагов производился в 10 полях зрения. Весь цифровой материал, полученный в ходе исследований статистически обработан с использованием t-критерия Стьюдента и программы MS EXCEL. Данное исследование было одобрено Этическим комитетом Ереванского государственного медицинского университета.

Результаты и их обсуждение

Селезенка представляет собой самый крупный периферический орган иммунной системы, реагирующий на любой иммунопатологический процесс в организме, обеспечивает гомеостаз эритроцитов и, поскольку в селезенку мигрируют некоторые плазматические клетки, принимает участие в эффекторной фазе гуморального иммунного ответа. Постоянные скопления макрофагов отмечаются в В- и Т-зависимых зонах фолликулов селезенки. Много макрофагов и в красной пульпе - в перегородках между венозными синусами, а часть - и в самих синусах. При этом, нередко встречаются многоядерные макрофаги, число ядер которых может достигать 10-12 в плоскости среза. Такие многоядерные клетки часто локализируются в венозных синусах селезенки, а также синусах и мозговых тяжах лимфатических узлов. Число макрофагов - величина непостоянная и зависит прежде всего от степени антигенного воздействия и фазы иммунного ответа. В процессе формирования иммунного ответа изменяется и число, и функциональная активность макрофагов в различных зонах периферических лимфоидных органов.

Уже давно известно, что в селезенке находится большая часть макрофагов организма. Различия меж-

ду синусоидальными клетками и истинными паренхиматозными макрофагами были получены методом световой микроскопии при гистохимическом изучении и применении техники импрегнации серебром. Dorfman R. F. показал, что интерстициальные макрофаги дают выраженную реакцию на кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу, в то время как синусоидальные клетки такой реакции не дают [2]. Размеры и форма макрофагов непостоянны, зависят, главным образом, от функциональных состояний. Диаметр их составляет от 10-15 до 100 мкм, ядра крупные, содержат ядрышко, хроматин в небольшом количестве конденсируется у ядерной оболочки. У макрофагов селезенки, как правило, наблюдается больше отростков, чем у макрофагов других тканей, причем те клетки, которые обладают наибольшей фагоцитарной активностью, имеют большее количество отростков. Они часто интердигитируют. Отличительным признаком макрофагов селезенки является также наличие в них многочисленных лизосом. Некоторые из них мелкие и гомогенные (первичные), но большинство крупные, иногда до 2-3 мкм в диаметре, гетерогенной структуры, содержащие фрагменты эритроцитов на разных стадиях разрушения, ферритин и миелиновые фигуры. Макрофаги захватывают старые и более хрупкие эритроциты, механически поврежденные при проникновении между эндотелиальными клетками синусов. Макрофаги могут содержать также захваченные лимфоциты на различных стадиях дезинтеграции – это так называемые окрашивающиеся тельца. В селезенке обнаруживаются макрофаги, окруженные группой старых эритроцитов, подвергающихся фагоцитозу; в то время как другие макрофаги окружены эритроблантами, либо содержат их. Макрофаги способствуют созреванию эритробластов. Захваченные эритроциты теряют свою гомогенность, становятся гетерогенными и гранулярными. Мембрана фагосомы встраивается в эритроцит и дегенерирующие остатки эритроцитов обнаруживаются в сложной путанице ходов («туннелизации»). Частицы ферритина собираются вдоль краев этого включения чуть ниже мембраны и затем проникают через мембрану в цитоплазму [5]. Таким образом, макрофаги селезенки представлены разнообразными клетками, различающимися по цитофункциональным и ультраструктурным особенностям. Макрофаги красной пульпы характеризуются наличием в них крупных сидерофагосом, макрофаги белой пульпы практически не содержат их. Отличительной чертой макрофагов красной пульпы является также их участие в образовании кровяных

островков, где они включаются во взаимоотношения с эритроидными клетками на различных стадиях дифференциации.

На основании проведенных морфометрических исследований при перенесенном хроническом стрессе (рис. 1, 2) установлено, что в селезенке наблюдается резкое уменьшение количества активных макрофагов по сравнению с количеством макрофагов в селезенке интактных животных (табл. 1, рис. 3). К наиболее подвижным клеткам относятся макрофаги красной пульпы селезенки. Их число подвержено колебаниям в наибольшей степени. В красной пульпе селезенки макрофаги располагаются и в перегородках между венозными синусами (селезеночные тяжи), и в просвете самих синусов. Иногда синусы бывают совершенно пусты (рис. 2). Число макрофагов в крови подчас превышает число макрофагов в межсинусовых перегородках. Переход макрофагов из стромы перегородок в просвет венозных синусов осуществляется довольно свободно благодаря своеобразному строению их стенки. В препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, ядра макрофагов характеризуются крупным, четко контурирующим ядрышком и глыбками хроматина, сконцентрированными у самой кариолеммы. Поэтому чаще ядра макрофагов имеют вид светлых пузырьков в отличие от более темных ядер фибробластов, в которых глыбки хроматина мелкие, но располагаются сравнительно компактно. Реже хроматин в ядрах макрофагов распределяется диффузно.

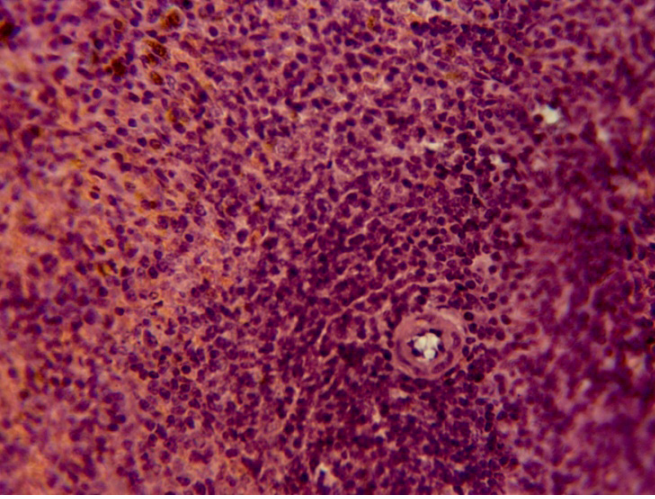
В селезенке животных этой группы происходило уменьшение объема, в большинстве препаратов визуализировались лимфоидные узелки с типичной структурой. В этой группе также отмечались сосудистые расстройства в форме отека стромы селезенки и полнокровия сосудов (рис. 1, 2).

Таблица 1

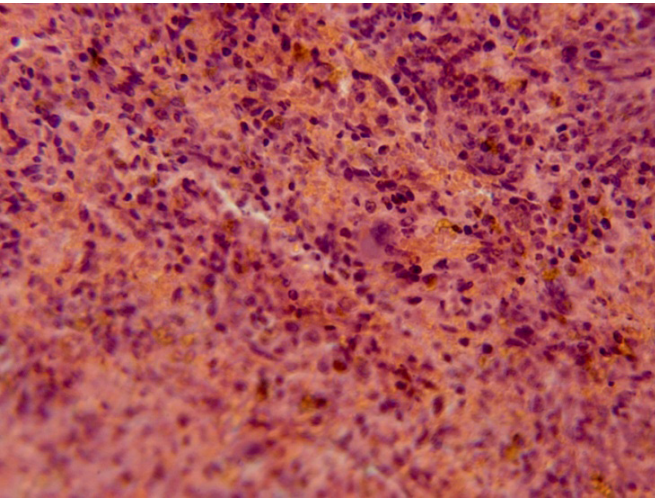
Количество макрофагов селезенки и тимуса

Группа животных	Количество макрофагов (M±m) (y. ед.)	
	Селезенка	Тимус
Контроль	26,45 ± 2,13	32,7 ± 2,4
Стресс	12,45 ± 2,06 P<0,005	21,6 ± 1,03 p<0,005

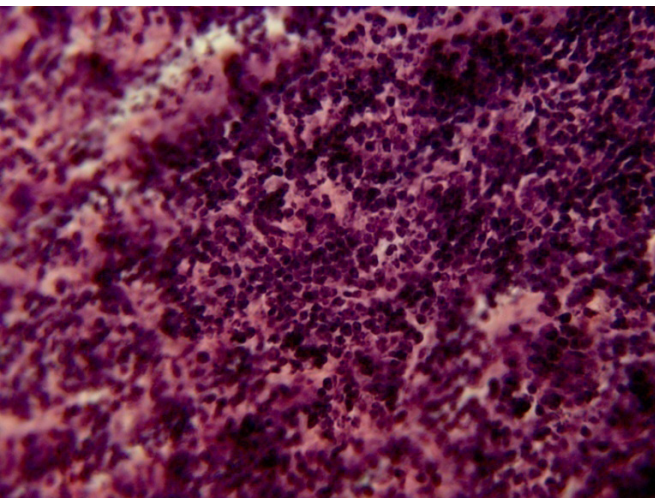
Макрофаги - основная популяция клеток тимуса наряду с лимфоцитами и эпителиальными клетками. Они распределены, по-видимому, случайным образом по коре и в мозговом веществе. Макрофаги тимуса



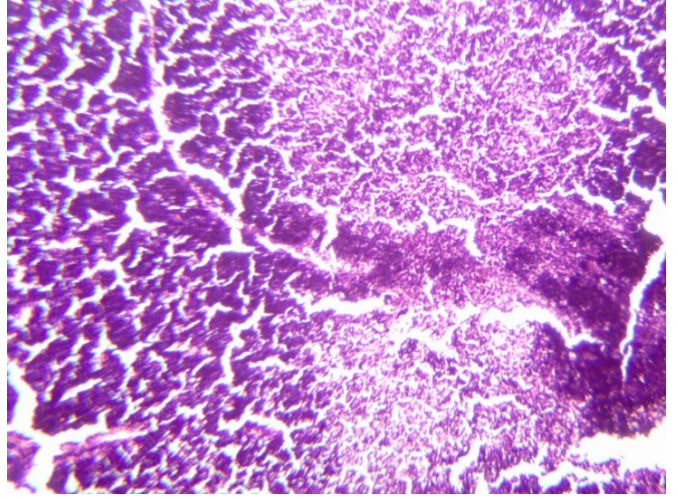
Րիս. 1 Սелезенկա, белая пульпа, стресс. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. x 400



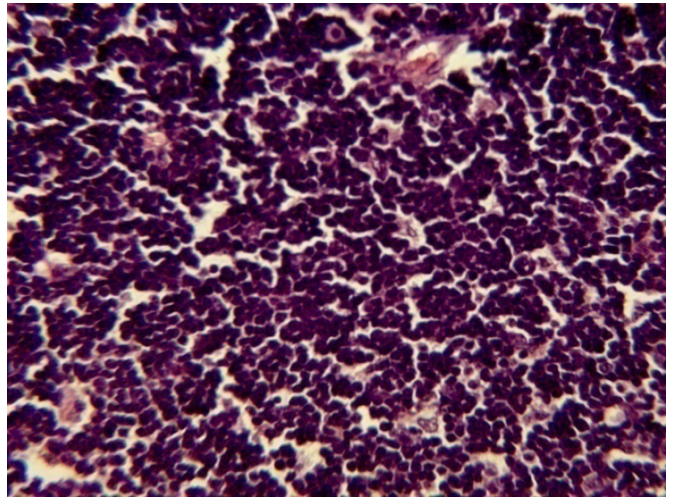
Րիս. 2 Սелезенկա, красная пульпа, стресс. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. x 400



Րիս. 3 Սелезенկա, белая пульпа, контроль. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. x 400



Րիս. 4 Тимус, контроль. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. x 100



Րիս. 5 Тимус, стресс. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. x 400

проявляют все различные идентифицирующие характеристики, связанные с макрофагами организма, включая экспрессию высокого уровня белков МНС (Major histocompatibility complex) классов I и II. На их долю приходится не менее 99% положительности тимуса Ia. Макрофаги тимуса проявляют способность связывать лимфоциты тимуса, а в некоторых случаях данные связанные лимфоциты фагоцитируются. Это может привести к формированию «клеток-нянек». Макрофаги тимуса могут также вызывать созревание лимфоцитов тимуса, и исследования с макрофагами, не относящимися к тимусу, предполагают, что созревание, вызванное макрофагами, ограничено МНС. Различные взаимоотношения между лимфоцитами и макрофагами в тимусе предполагают, что взаимодействие между этими двумя типами клеток имеет решающее значение для созревания тимоцитов, создания ограничения МНС и выработки толерантности к некоторым аутоантигенам [11]. Макрофаги, расположенные в кортико-медуллярной зоне тимуса, принимают участие в следующих процессах:

- ◆ метаболизме, синтезе и производстве биоактивных липидов, вероятно метаболитов арахидоновой кислоты, в зависимости от их гистохимических и ферментно-гистохимических свойств;
- ◆ в процессе отрицательного отбора лимфоцитов, который происходит в тимусе на основании их ультраструктурных особенностей и их реактивности после применения токсических или иммунодепрессивных/иммуномодулирующих агентов – таким образом обуславливают процесс иммунологической толерантности [7].

В группе животных, перенесших стресс, в ткани тимуса отмечались, прежде всего, сосудистые расстройства (отек соединительной ткани и полнокровие сосудов). Что касается изменений лимфоидной ткани, то они были выражены в разной степени в разных долях у одних и тех же особей. У всех животных экспери-

ментальной группы также наблюдалась инверсия слоев, что типично для акцидентальной инволюции тимуса при стрессе. У части экспериментальных крыс данной группы отмечалось исчезновение инверсии слоев в отдельных долях тимуса (с истощением не только мозгового, но и коркового слоя тимуса), что проявлялось обеднением слоев клетками лимфоидного ряда и исчезновением четких границ между слоями (рис. 2). В мозговом и корковом слоях тимуса визуализировались участки гибели лимфоцитов. В тимусе крыс, перенесших стресс, отмечается снижение количества макрофагов по сравнению с контрольной группой. Кроме того, отмечается сглаживание кортико-медуллярной границы в результате снижения количества кортикальных лимфоцитов (рис. 4, 5).

Заключение

Таким образом, при сопоставлении данных гистологического исследования органов животных экспериментальной и контрольной групп было выявлено следующее. У крыс, подвергнутых острому стрессу, в органах иммунной системы были обнаружены изменения, характерные для острого стресса: уменьшение лимфоидной ткани в тимусе и селезенке. Итак, хроническое действие психоэмоциональных факторов неблагоприятно влияет на структурно-функциональное состояние макрофагов селезенки и тимуса. Результаты проведенных экспериментов показали, что имеет место выраженная тенденция к снижению количества макрофагов в исследуемых органах при хроническом психоэмоциональном стрессе, что свидетельствует о подавлении активности иммунитета у исследуемых животных, которое проявляется снижением количества макрофагов в паренхиме селезенки и тимуса. Таким образом, хронический психоэмоциональный стресс оказывает пагубное воздействие на «иммунный гомеостаз» селезенки и тимуса, снижая не только общее количество макрофагов, но и приводя к различным структурным изменениям паренхимы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселева Н.М., Кузьменко Л.Г., Нкане Нко М.М. Стресс и лимфоциты. Педиатрия 2012; 91 (1): 137–143
2. Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., Van Dyke T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. Periodontol., 2000, 2014;64(1):57-80, doi:10.1111/prd.12002
3. Dorfman R.F. Nature of the sinus lining cells of the spleen. Nature, 1961;190:1021-2, doi: 10.1038/1901021a0
4. Gonzalez N., Castrillo A. Origin and specialization of splenic macrophages Cell Immunol., 2018; 330:151-158. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.05.005
5. Gordon S., Pl ddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. BMC Biol., 2017;15(1):53. doi:10.1186/s12915-017-0392-4
6. Labro M.T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: Immunomodulation or “Immuno-Fairy Tales”? Clin. Microbiol. Rev., 2000;13(4):615-650. doi:10.1128/CMR.13.4.615-650.2000
7. Mili evi N., Mili evi Z. Metallophilic macrophages of the rodent thymus. Prog. Histochem. Cytochem., 2013; 48(1):1-46. doi: 10.1016/j.proghi.2012.12.001
8. Perdiguero G.E., Geissmann F. Myb-independent macrophages: a family of cells that develops with their tissue of residence and is involved in its homeostasis. Cold Spring Harb. Symp., Quant. Biol., 2013;78:91–100
9. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol., 2011;11:762–774
10. Sieweke M.H., Allen J.E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. Science 2013;342:1242974
11. Wood G.W. Macrophages in the thymus Surv Immunol. Res., 1985;4(3):179-91. doi: 10.1007/BF02918671
12. Yona S., Gordon S. From the reticuloendothelial to mononuclear phagocyte system - The unaccounted years [Internet]. V. 6, Frontiers in Immunology. Frontiers Research Foundation; 2015 [cited 2020 May 13]. p. 328. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191061>

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

ՔՐՈՆԻԿԱԿԱՆ ԱԹՐԵՍԻ ԵՆԹԱՐԿՎԱԾ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՓԱՅՑԱՂԻ ԵՎ ՈՒՐՑԱԳԵՂՁԻ ՄԱԿՐՈՖԱԳԵՐԻ ՄՈՐՖՈՖՈՒԿՑԻՈՆԱԼ ՋԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Դոյրդյան Լ.Ս.¹, Առաքելյան Գ. Գ.², Սարոյան Մ.Յու.¹, Խուրազկերոյան Դ.Ն.¹, Թորգոմյան Ա. Լ.^{1*}

¹ ԵՊԲՀ, Երևան, Հայաստան, ֆիզիոլոգիայի ամբիոն

² Սեչենովի անվան Մոսկվայի առաջին պետական բժշկական համալսարան, Մոսկվա, ՌԴ

Բանալի բառեր` մակրոֆագ, փայծաղ, ուրցագեղձ, սթրես, իմունիտետ:

Ժամանակակից աշխարհում մարդու մարմնի վրա ազդող բացասական գործոններից սթրեսը նշանակալի տեղ ունի: Այլևս չեք հանդիպի մի մարդու, որը պարբերաբար չի ենթարկվում սթրեսի վնասակար ազդեցությանը: Սթրեսի կործանարար ազդեցությունը գիտակցելու ուղիներից մեկը մարդու իմունիտետի տարբեր բաղադրիչների փոփոխությունն է:

Ջետազոտության նպատակն է մանրադիտակային մեթոդով ուսումնասիրել քրոնիկական համակցված սթրեսի ենթարկված առնետների փայծաղի և ուրցագեղձի մակրոֆագերի մորֆոլոգիական և ֆունկցիոնալ փոփոխությունները հսկիչ խմբի համեմատ:

Ուսումնասիրություններն իրականացվել են 20 ցեղային առնետների վրա` քրոնիկական հոգեհուզական սթրեսի ազդեցությունից առաջ և հետո: Որպես հյուսվածքաբանական հետազոտության նյութ` օգտագործվել են փայծաղի և ուրցագեղձի կտորներ: Մակրոֆագերը հայտնաբերելու համար կենդանիներին սպանդից 1 ժամ առաջ ներարկվել է ներկի լուծույթ: Փորձի ընթացքը հաստատվել է ԵՊԲՀ-ի էթի-

կայի հանձնաժողովի կողմից:

Ուսումնասիրության ընթացքում փայծաղի և ուրցագեղձի հյուսվածքներում նկատվել են մկրոֆագերի տեսանելի քանակական և որակական փոփոխություններ, մինչդեռ մակրոֆագերի քանակը զգալիորեն կրճատվել է, որը վկայում է սթրեսի պատճառով իմունային համակարգի գործունեության ճնշման մասին:

Այսպիսով, քրոնիկական հոգեհուզական սթրեսը վնասակար ազդեցություն է ունենում փայծաղի և ուրցագեղձի «իմունային հոմեոստազի» վրա` նվազեցնելով ոչ միայն մակրոֆագերի ընդհանուր քանակը, այլև պարենքիմի տարբեր կառուցվածքային փոփոխությունների հանգեցնելով:

SUMMARY

THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDY OF SPLEEN AND THYMUS MACROPHAGES IN RATS UNDERGONE LONG LASTING STRESS

Doydoyan L.¹, Arakelyan G.², Saroyan M.¹, Khudaverdyan D.¹, Torgomyan A.¹

¹Department of Physiology, Yerevan State Medical University, Yerevan, Armenia

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, RF

Keywords: *macrophage, spleen, thymus, stress, immune system.*

In the modern world, out of the whole spectrum of negative factors affecting the human body, stress has its permanent and significant place. You will no longer meet a person who is not exposed to stress periodically. One of the ways to implement the destructive effect of stress is to change the various components of human immunity.

The aim of this study is to examine morphological and functional changes in the macrophages of spleen and thymus by microscopic examination of these organs in rats exposed to chronic combined stress and to determine the number of macrophages in stress-induced parenchyma compared with the control group.

Studies were conducted on 20 outbred male rats, before and after exposure to chronic psycho-emotional stress. The ma-

terial for histological examination was pieces of the spleen and thymus. To identify macrophages, the animals were pre-administered with a dye solution an hour before the euthanasia.

Visible quantitative and qualitative changes in the spleen and thymus were observed. There was a decrease in the number of macrophages, which indicates a stress-induced suppression of immune system activity.

Thus, chronic psycho-emotional stress has a detrimental effect on the “immune homeostasis” of the spleen and thymus, reducing not only the total number of macrophages, but also leading to various structural changes in the parenchyma.