

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ КРЫС И ЕГО ОБРАТИМОСТЬ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Н.А. Мураева, Т.С. Смирнова, О.В. Фёдорова, Ю.А. Ткаченко, Л.В. Вондрачек

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии

Изучено влияние хронического стресса на лимфоидные органы и его обратимость в зависимости от продолжительности воздействия. Крысы-самцы подвергались стрессорному воздействию – ограничению движения и принудительному плаванию ежедневно в течение 2, 4 и 8 недель. После каждого периода воздействия крысам давали возможность восстановиться в течение 6 недель. Стрессовое воздействие приводило к зависимому от его длительности снижению массы тимуса и подмышечных лимфатических узлов, количества лимфоцитов селезенки, тимуса и подмышечных лимфатических узлов и увеличению апоптотического индекса спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов. Тимус был наиболее чувствительным к стрессу лимфоидным органом. При стрессовом воздействии 2 и 4 недели параметры селезенки и большинство параметров тимуса и подмышечных лимфатических узлов у крыс после восстановления вернулись к контрольному уровню, но не у группы с 8 неделями стрессового воздействия. Выраженность стрессового воздействия на лимфоидные органы возрастает с увеличением продолжительности воздействия, и при более коротком периоде воздействия быстрее происходит восстановление.

Ключевые слова: лимфоидные органы, обратимость, селезенка, тимус, подмышечные лимфатические узлы, стресс.

DOI 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-177-180

EFFECT OF CHRONIC STRESS ON PRIMARY AND SECONDARY LYMPHOID ORGANS OF RATS AND ITS REVERSIBILITY DEPENDING ON THE DURATION OF STRESS EXPOSURE

N. A. Muraeva, T.S. Smirnova, O.V. Fedorova, Yu.A. Tkachenko, L.V. Vondrachek

FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Department of histology, embryology, cytology

The influence of chronic stress on the lymphoid organs and its reversibility depending on the duration of exposure was studied. Male rats were subjected to stress – restricted movement and forced swimming daily for 2, 4 and 8 weeks. After each exposure period, the rats were allowed to recover for 6 weeks. Stress exposure led to a decrease in the mass of the thymus and axillary lymph nodes, the number of spleen lymphocytes, thymus and axillary lymph nodes, and an increase in the apoptotic index of splenocytes, thymocytes and lymphocytes of axillary lymph nodes, depending on its duration. The thymus was the most stress-sensitive lymphoid organ. After 2 and 4 weeks of stress exposure, the spleen parameters and most of the parameters of the thymus and axillary lymph nodes in rats returned to the control level after recovery, but not in the group with 8 weeks of stress exposure. The severity of stress on the lymphoid organs increases with the duration of exposure, and with a shorter period of exposure, recovery occurs faster.

Key words: corticosterone, lymphoid organs, reversibility, spleen, thymus, axillary lymph nodes, stress.

Стресс влияет на лимфоидные органы, что выражается в снижении веса, клеточности и изменения гистологической структуры [6, 8, 9]. Дифференциальная чувствительность первичных и вторичных лимфоидных органов к воздействию стресса и медиаторам стресса не до конца изучена. Влияние стресса на лимфоидные органы изучалось либо в краткосрочной перспективе, либо при длительном воздействии [2, 4, 7, 9], в течение одной продолжительности стрессового воздействия. Обратимость стрессовых воздействий на лимфоидные органы изучена после

однократного стрессового воздействия [5], вне зависимости от продолжительности стрессового воздействия.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить чувствительность индуцированных хроническим стрессом воздействий на различные лимфоидные органы с увеличением продолжительности воздействия, а также обратимость изменений в лимфоидных органах в зависимости от продолжительности воздействия.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались экспериментальные животные – белые крысы массой 200–250 г. Работа проведена с соблюдением требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными. Для индуцирования стресса использовались два типа стрессоров:

1) удерживающее устройство: крыс помещали в цилиндрическое устройство диаметром 6,7 см и длиной 22,2 см в течение 1 ч;

2) принудительное плавание: крыс заставляли плавать в стеклянной хроматографической банке (высота 45 см, наружный диаметр 22,2 см), заполняемой на 2/3 водой, в течение 15 мин при комнатной температуре.

Взрослые самцы крыс были случайным образом разделены на контрольную ($n = 15$) и стрессовую ($n = 30$) группы. Контрольные крысы содержались без каких-либо нарушений. Крысы в группе стресса подвергались ограничению в течении 1 ч с последующим принудительным плаванием 15 мин после перерыва в 4 ч – каждый день в течение 2, 4 и 8 недель. После каждого периода пять крыс из контрольной и пять из стрессовой групп подвергли эвтаназии и некропсии. Оставшиеся крысы из стрессовой группы содержались без воздействия стрессоров в течение 6 недель, составив группы восстановления, по пять крыс после каждого периода воздействия, после чего их лимфоидные органы также были исследованы.

При вскрытии удаляли селезенку, тимус и подмышечные лимфатические узлы, очищали от жира, взвешивали и выделяли клетки для анализа апоптоза. Селезенку, тимус и подмышечные лимфатические узлы продавливали через стерильную нейлоновую сетку 400 мкм для сбора спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов. Клеточную суспензию центрифугировали при 2000 об./мин при 4 °C в течение 5 мин. Клетки собирали, промывали и суспендировали в среде HBSS, количество клеток определяли счетной камерой Нойбауэра.

По десять микролитров бромида этидия, акридинового оранжевого и одной клеточной суспензии спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов смешивали, загружали в счетную камеру и давали постоять. Клетки наблюдали под флуоресцентным микроскопом (Zeiss Imager, A2) с использованием фильтров 450 и 530 Нм, где здоровые клетки выглядели зелеными, а апоптотические – красными. Наблюдали случайно отобранные 500 клеток на образец крысы каждого органа и регистрировали количество здоровых (зеленых) и апоптотических (красных) клеток. Апоптотический индекс =

(количество апоптотических клеток/общее количество подсчитанных клеток) × 100.

Концентрацию кортикостерона в сыворотке крови определяли количественно с помощью набора ELISA (Demeditec diagnostics GmbH, Германия).

Среднее значение ± SE каждого параметра вычисляли с учетом данных на 5 крысах в каждой группе, а средние значения каждого параметра в разных группах сравнивали с помощью ANOVA с последующим тестом множественного диапазона Дункана и оценивали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Масса тела крыс, подвергнутых стрессу в течение 2, 4 и 8 недель, показала значительное снижение, зависимое от длительности воздействия по сравнению с соответствующими контрольными группами. У крыс группы восстановления после 2- или 4-недельного стресса масса тела была значительно выше, чем у стрессовых групп, тогда как в группе восстановления после 8-недельного воздействия она была значительно ниже, чем в контроле, и была аналогична группе стресса.

Стресс приводит к снижению относительной массы лимфоидных органов [8]. Относительная масса селезенки, тимуса и подмышечных лимфатических узлов крыс, подвергшихся стрессу в течение 2, 4 и 8 недель, показала достоверное снижение по сравнению с соответствующими контрольными группами.

Относительная масса селезенки и подмышечных лимфатических узлов в группах восстановления после 2-недельного и 4-недельного стресса не отличалась от соответствующих контрольных показателей. У крыс группы восстановления после 8-недельного стресса она не отличалась от группы стресса. Относительная масса тимуса группы восстановления после 2-недельного стресса не отличалась от контроля, а после 4-недельного и 8-недельного стресса достоверно не отличалась от соответствующих групп стресса.

Сывороточная концентрация кортикостерона была достоверно повышена у крыс группы стресса всех трех длительностей по сравнению с контролем. Значительное повышение сывороточной концентрации кортикостерона при снижении массы тела крыс после воздействия указывают на то, что крысы испытывали стресс, и регрессивные изменения в лимфоидных органах были реакцией на стресс. В группах восстановления после 2 и 4 недель стресса концентрация кортикостерона в сыворотке крови была аналогична таковой в контроле, но не у крыс группы восстановления после 8 недель стресса.

Стресс влияет на снижение клеточности лимфоидных органов [1, 3, 8]. Количество спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов было достоверно ниже у стрессовых крыс всех сроков воздействия по сравнению с контрольными группами. Клеточность селезенки и тимуса восстановилась до контрольных уровней в группах восстановления после 2 и 4 недель стрессового воздействия, после стрессового воздействия 8 недель – не восстановилась. Количество лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов было восстановлено до контрольных уровней у крыс с 2-недельным стрессовым воздействием, но не после 4- и 8-недельного воздействия.

Большее количество апоптотических клеток (красных) и меньшее количество здоровых клеток (зеленых) наблюдалось у стрессовых крыс всех длительностей по сравнению с контролем во всех типах клеток лимфоидных органов. Значительное увеличение апоптотического индекса клеток лимфоидных органов наблюдалось у стрессовых крыс всех трех длительностей воздействия по сравнению с контролем.

Апоптотический индекс спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов крыс группы восстановления после 2-недельного и 4-недельного стресса не отличался от контроля. У крыс группы восстановления после 8-недельного стресса он был достоверно ниже, чем у стрессовых крыс, и достоверно выше, чем у контрольных.

Зависимое от длительности воздействия увеличение апоптотического индекса спленоцитов, тимоцитов и лимфоцитов подмышечных лимфатических узлов указывает на то, что стрессовые эффекты становятся более выраженными с увеличением продолжительности воздействия.

Обнаружена дифференцированная стрессовая реакция лимфоидных органов на хронический стресс. Все изученные параметры лимфоидных органов показали значительные изменения через 2 недели стрессового воздействия, свидетельствующие о том, что лимфоидные органы очень чувствительны к стрессовым воздействиям даже при более короткой продолжительности воздействия. Большинство параметров тимуса показали максимальные изменения через 2 недели стрессового воздействия, а показатели селезенки и подмышечных лимфатических узлов показали резкие изменения через 4 недели стрессового воздействия. Таким образом, тимус более чувствителен к стрессовым воздействиям по сравнению с другими лимфоидными органами.

У крыс групп восстановления после 2 и 4 недель воздействия все параметры селезенки и большая часть параметров тимуса и подмышечных лимфатических узлов были полностью восстановлены до контрольных

уровней, тогда как большинство параметров этих органов крыс группы восстановления после 8 недель воздействия были аналогичны группе стресса. Параллельно с этим концентрация кортикостерона в сыворотке крови восстанавливалась до контрольных уровней в группах восстановления после 2 или 4 недель стресса, но не после 8 недель воздействия.

Неспособность лимфоидных органов вернуться к нормальному состоянию после 8-недельного воздействия может быть вызвана продолжающейся активацией гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси даже после отмены стрессора, так как в данной группе восстановления преобладают более высокие уровни сывороточного кортикостерона по сравнению с контрольной группой. Но при этом концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс этой группы восстановления значительно ниже, чем у крыс группы стресса. Предположительно, при данном стрессовом воздействии концентрация кортикостерона в сыворотке крови могла достичь контрольных уровней при более длительном периоде восстановления. Таким образом, неспособность вернуться к контрольным уровням при восстановлении после 8-недельного воздействия, скорее всего, обусловлена более высокой концентрацией кортикостерона, а не необратимым повреждением, вызванным стрессом. Для подтверждения этой точки зрения необходимы исследования с более длительными периодами восстановления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показывают, что увеличение продолжительности стрессового воздействия приводит к более серьезному повреждению лимфоидных органов и что чем короче период воздействия, тем быстрее происходит выздоровление.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маткина О.В. Патогистологические изменения в тимусе и селезенке неинбредных белых крыс при остром стрессе // Пермский медицинский журнал. – 2014. – Т. 31, № 1. – С. 121–128.
2. Мураева Н.А. Влияние хронического стресса на массу тела и иммунных органов экспериментальных животных раннего возраста // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 3–7.
3. Нестерова А.А., Загребин В.Л., Мураева Н.А., Краюшкина Н.Г. Динамика клеточных популяций белой пульпы селезенки при хроническом стрессе в раннем постнатальном онтогенезе // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2012. – Т. 1, № 2. – С. 60–61.
4. Archana R. Effect of chronic noise stress on neutrophil functions in rats // Am. Int. J. Res. Form. App. Nat. Sci. – 2013. – No. 3. – С. 88–92.

5. Divyashree S., Sarjan H.N., Yajurvedi H.N. Effects of long-term chronic stress on the lymphoid organs and blood leukocytes of the rat (*Rattus norvegicus*) // *Can. J. Zool.* – 2016. – No. 94. – P. 137–143.

6. Hernandez M.E., Martinez-Mota L., Salinas C., et al. Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in Wistar – Kyoto rats // *Biomed Res. Int.* – 2013. – P. 1–6.

7. Moazzam S., Hussain M.M., Babar A. Response of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and immune system to chronic restraint stress in male Sprague dawley rats // *Pak. J. Physiol.* – 2013. – No. 9. – P. 29–31.

8. Sarjan H.N., Divyashree S., Yajurvedi H.N. The protective effect of the Vacha rhizome extract on chronic stress induced immunodeficiency in rats // *Pharma Biol.* – 2017. – No. 55. – P. 1358–1367.

9. Srinivasan S., Loganathan S., Wankhar W., et al. Stress effect on humoral and cell mediated immune response: indispensable part of corticosterone and cytokine in neutrophil function // *Trials Vaccinol.* – 2016. – No. 5. – P. 61–70.

REFERENCES

1. Matkina O.V. Patogistologicheskie izmeneniya v timuse I selebenke neinbrednykh belykh kryz pri ostrom stresse [Pathohistological changes in inbred white rats' thymus and spleen during acute stress]. *Permskiy meditsinskiy zhurnal* [Perm Medical Journal], 2014, vol. 31, no. 1, pp. 121–128. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Muraeva N.A. Vliyanie khronicheskogo stressa na massy tela i immunnykh organov eksperimental'nykh zivotnykh rannego vozrasta [Influence of chronic stress on body weight and weight of immune organs of experimental animals of early

age]. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal* [Volgograd Journal of Medical Research], 2019, no. 4, pp. 3–7. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Nesterova A.A., Zagrebin V.L., Murayeva N. A., Krayushkina N.G. Dinamika kletochnykh populyatsiy beloy pul'py selesenki pri khonicheskom stresse v rannem postnatal'nom ontogeneze [Dynamics of the Cell Population in the White Pulp of the Spleen Under the Chronic Stress]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii* [Journal of Anatomy and Histopathology], 2012, vol. 1, no. 2, pp. 60–61. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Archana R. Effect of chronic noise stress on neutrophil functions in rats. *Am. Int. J. Res. Form. App. Nat. Sci.*, 2013, no. 3, pp. 88–92.

5. Divyashree S., Sarjan H.N., Yajurvedi H.N. Effects of long-term chronic stress on the lymphoid organs and blood leukocytes of the rat (*Rattus norvegicus*). *Can. J. Zool.*, 2016, no. 94, pp. 137–143.

6. Hernandez M.E., Martinez-Mota L., Salinas C., et al. Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in Wistar – Kyoto rats. *Biomed Res. Int.*, 2013, pp. 1–6.

7. Moazzam S., Hussain M.M., Babar A. Response of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and immune system to chronic restraint stress in male Sprague dawley rats. *Pak. J. Physiol.*, 2013, no. 9, pp. 29–31.

8. Sarjan H.N., Divyashree S., Yajurvedi H.N. The protective effect of the Vacha rhizome extract on chronic stress induced immunodeficiency in rats. *Pharma Biol.*, 2017, no. 55, pp. 1358–1367.

9. Srinivasan S., Loganathan S., Wankhar W., et al. Stress effect on humoral and cell mediated immune response: indispensable part of corticosterone and cytokine in neutrophil function. *Trials Vaccinol.*, 2016, no. 5, pp. 61–70.

Контактная информация

Мураева Наталья Алексеевна – к. м. н., доцент, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: natalia.muraewa@yandex.ru