

УДК 612.33.14.46

Влияние некоторых олигопептидов на иммунные структуры лимфоидных бляшек тонкой кишки

(Экспериментальное исследование)

А.А. Бахмет

(Кафедра анатомии человека Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова)

Effect of some oligopeptides on immune structures of lymph follicles of small intestine (experimental study)

A.A. Bakhmet

Цель исследования. Изучить строение функционально активных зон лимфоидных бляшек тонкой кишки, их клеточный состав и цитоархитектонику, содержание форменных элементов периферической крови в условиях *эмоционального стресса* (ЭС), а также после предварительного введения в организм пептида, вызывающего *дельта-сон* (ПВДС) и семакса (синтетического аналога АКТГ 4-10).

Материал и методы. Исследованы микротопография лимфоидных бляшек тонкой кишки и мазки периферической крови 104 крыс линии Вистар (экспериментальных и контрольных групп) с различным типом индивидуальной устойчивости к воздействию стресса. Предварительно применялся тест «Открытое поле», позволяющий разделить животных в отношении их устойчивости к стрессорным воздействиям. Крысы были забиты методом декапитации через 1 ч после воздействия ЭС. Микроскопическая анатомия функционально активных зон лимфоидных бляшек тонкой кишки изучалась с помощью современных гистологических и иммуногистохимических методов.

Результаты. Установлено, что введение в организм ПВДС и семакса оказывает стресслимитирующее влияние на макрофаго-пролиферативные и деструктивные процессы в функционально активных зонах селезенки и лимфоидных бляшек тонкой кишки. Содержание малых лимфоцитов в центрах размножения лимфоидных бляшек после 1-часового стрессорного воздействия у устойчивых и предрасположенных экспериментальных крыс снижалось соответственно в 1,2 и 1,4 раза по сравнению с результатами контрольных групп. У стрессоустойчивых крыс в центрах размножения лимфоидных

Aim of investigation. To study a structure of functionally active zones of lymph patches of small intestine, their cellular composition and cytoarchitectonics, contents of peripheral blood units in a state of *emotional stress* (ES), and also after preliminary injection of *delta-sleep inducing peptide* (DSIP) and *semax* (ACTH 4–10 synthetic analogue).

Stuff and methods. The microtopography of lymph patches of small intestine and smears of peripheral blood of 104 Wistar rats (experimental and control groups) with various types of individual stress resistance were studied. The «open field» test was applied preliminarily, that allowed to divide animals according to resistance to stressful stimuli. Rats have been killed by decapitation method within 1 h after exposure to ES. Microscopical anatomy of functionally active zones of lymph patches of small intestine was studied by modern and immunohistochemical methods.

Results. It was revealed, that injections of DSIP and semax have a stress-limiting action on macrophageal, proliferative and destructive processes in functionally active zones of spleen and lymphoid patches of small intestine. Contents of small lymphocytes at germinal centers of lymphoid patches after 1-hour stress exposure in resistant and predisposed experimental rats dropped respectively 1,2 and 1,4 times in comparison to results in control groups. At stress-resistant rats in germinal centers of small intestine lymphoid patches at injection of semax after 1-hour stress exposure value of this parameter basically did not change and was 58% (57% – in the control group). At the predisposed rats, that experienced ES with preliminary semax injection, contents of small lymphocytes slightly increased in comparison to controls and was equal to 64,8%

бляшек тонкой кишки при введении семакса после 1-часового стрессорного воздействия значение данного показателя практически не изменялось и составляло 58% (в контроле 57%). У предрасположенных крыс, испытывавших ЭС с предварительным введением семакса, содержание малых лимфоцитов несколько возросло по сравнению с контролем и составляло 64,8% (в контроле 60,0%). Введение в организм стресслимитирующих олигопептидов (ПВДС и семакса) способствовало снижению стресс-индуцированного состояния клеток лимфоидного ряда в периферической крови, а также в лимфоидных структурах селезенки и лимфоидных бляшек тонкой кишки.

Выводы. Полученные данные целесообразно учитывать при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, иммунной системы, а также при лечении и профилактике различных стресс-индуцированных состояний. Результаты исследования позволяют оценить компенсаторные возможности органов иммунной системы при воздействии ЭС (например, при эрозиях и стрессовых язвах слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки), а также могут быть полезны в клинической практике гастроэнтеролога, аллерголога, иммунолога. Основываясь на них, можно рекомендовать введение ПВДС и семакса для лечения и профилактики различных стресс-индуцированных состояний.

Ключевые слова: тонкая кишка, стресс, иммунная система, крысы.

(60,0% – in the control group). Injection of stress-limiting oligopeptides (DSIP and semax) promoted decrease of stress-induced changes of lymphoid cells in peripheral blood, and also in lymphoid tissue of spleen and small intestine lymph patches.

Conclusions. Obtained data can be applied at treatment of diseases of gastro-intestinal tract, immune system, and also at treatment and prophylaxis of various stress-related states. Study results allow to estimate compensatory potentials of immune organs at exposure to ES (for example, at erosions and stressful ulcers of gastric and duodenal mucosa), and also can be helpful in clinical practice of gastroenterologist, allergist, immunologist. Basing on these results, it is possible to recommend application of DSIP and semax for treatment and prophylaxes of various stress-induced states.

Key words: small intestine, stress, immune system, rats.

В последнее время иммунологическим нарушениям как проявлениям реакции на стресс отводится основная патогенетическая роль в развитии сердечно-сосудистых, нервно-психических заболеваний, а также диффузных заболеваний соединительной ткани, желудочно-кишечного тракта и др. [4, 10, 19]. Стрессорные воздействия, обусловленные разнообразными эмоциональными переживаниями, или так называемый «эмоциональный стресс» (ЭС), сопровождают человека на протяжении всей жизни. В связи с этим в научной литературе имеются многочисленные работы, посвященные изучению влияния эмоционального стресса на различные органы иммунной системы [9, 15, 17], на некоторые показатели периферической крови у животных в эксперименте [15, 18].

В исследованиях К.В. Судакова и соавт. было показано, что пептид, вызывающий дельта-сон (ПВДС), принадлежит к регуляторным олигопептидам, обладающим выраженными антистрессорными свойствами. Известно, что инъекция ПВДС способствует выживанию экспериментальных животных в условиях острого эмоционального стресса, улучшает мозговой кровоток, уменьшает стрессорные сосудистые реакции, оказывает антиаритмическое влияние [11, 12]. Семакс (синтетический аналог АКТГ 4-10), обладающий антистрессорным действием, используется в клинической

практике для лечения различных заболеваний центральной нервной системы и как адаптоген для здоровых людей в экстремальных условиях [1]. Однако в современной литературе данных о структурно-функциональных характеристиках микроанатомии и о клеточном составе функционально активных зон органов иммунной системы в условиях стресса, а также при введении ПВДС и семакса у животных с различной стрессоустойчивостью крайне недостаточно. В связи с этим исследование морфологической характеристики иммунных (лимфоидных) структур селезенки, лимфоидных бляшек тонкой кишки и периферической крови у животных с различной индивидуальной стрессоустойчивостью при воздействии эмоционального стресса, введении ПВДС и семакса сохраняет свою актуальность как в теоретическом, так и в практическом отношении.

Целью настоящего исследования явилось изучение строения функционально активных зон лимфоидных бляшек тонкой кишки, их клеточного состава и цитоархитектоники, содержания форменных элементов в периферической крови в условиях эмоционального стресса, а также после предварительного введения в организм ПВДС и семакса.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили препараты селезенки, лимфоидных бляшек тонкой кишки, а также мазки периферической крови 104 крыс весом 280–300 г линии Вистар (экспериментальные и контрольные группы). Предварительно применялся тест «Открытое поле», позволяющий разделить животных в отношении их устойчивости к стрессорным воздействиям [3, 11]. Эксперимент проведен на базе Института физиологии РАН им. П.К. Анохина в соответствии с приказами Минвуза СССР № 742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.1985 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных».

У всех подопытных крыс определяли эмоциональную резистентность по индексу двигательной активности в тесте «Открытое поле» [11]. Животные, показавшие активную двигательную реакцию в данном тесте, были отнесены к прогностически устойчивым, а особи с пассивной двигательной реакцией – к прогностически предрасположенным к эмоциональному стрессу. Контрольную группу составили 11 предрасположенных и 13 устойчивых животных, которые были забиты через 1 ч после внутрибрюшинной инъекции 0,2 мл физиологического раствора.

Были выделены также группы животных (8 устойчивых и 8 предрасположенных к ЭС), которых после внутрибрюшинной инъекции 0,2 мл физиологического раствора на 1 ч помещали в условия острого эмоционального стресса: иммобилизация в тесном «домике» с одновременным стохастическим (апериодическим) надпороговым электрокожным раздражением [3, 11]. Животные этой группы были декапитированы через 1 ч после начала иммобилизации.

Кроме того, выделены группы контрольных животных (8 устойчивых и 8 предрасположенных к ЭС), которым за 1 ч до декапитации внутрибрюшинно вводили растворы ПВДС и семакса. После инъекции аналогичных растворов экспериментальные устойчивые и предрасположенные группы животных также были подвергнуты остро-

му эмоциональному стрессу в течение 1 ч, а затем забиты декапитацией.

Микроскопическая анатомия функционально активных зон лимфоидных бляшек тонкой кишки изучалась на поперечных и продольных срезах толщиной 5–6 мкм, которые окрашивали современными гистологическими (гематоксилином и эозином, гематоксилином по Гайденгайну, ацаном по Гольден Массони), а также иммуногистохимическими методами (с помощью иммунопероксидазного РАР метода с применением моноклональных антител специфичности СД5). Мазки периферической крови окрашивали по Романовскому–Гимзе. Исследование окрашенных гистологических и иммуногистохимических срезов лимфоидных бляшек проводили на светооптическом микроскопе «Биолан» при следующем увеличении: окуляр 10*объектив 8;40;90.

Статистическая обработка полученных данных включала подсчет среднеарифметических показателей абсолютных и относительных величин (x) и их ошибки (S_x). Достоверность отличий средних величин оценивали методом доверительных интервалов по критерию t -Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение микротопографии лимфоидных бляшек тонкой кишки показало, что через 1 ч после воздействия эмоционального стресса крысы, предрасположенные к нему, в большей степени реагируют на стресс, чем устойчивые. Установлено, что плотность расположения клеточных элементов на единице площади в периартериальных лимфоидных муфтах селезенки крыс, как потенциально устойчивых, так и предрасположенных к стрессу, достоверно ($p < 0,05$) снижалась в 1,2 и 1,6 раза соответственно по сравнению с данными контрольных групп (см. таблицу). Аналогичная реакция так называемого «клеточного опустошения» без признаков распада лимфоцитов наблюдалась рядом авторов в тимусе, лимфатических узлах и селезенке мышей, подвергшихся стрессу, но в более поздние сроки после его воздействия (от 3 ч до 14 дней) [14, 17].

У устойчивых крыс, испытавших эмоциональный стресс с предварительным введением ПВДС,

Плотность расположения клеточных элементов в центрах размножения лимфоидных бляшек тонкой кишки в изучавшихся группах животных ($x \pm S_x / \text{min-max}$)

Показатель	Группа животных			
	контроль – устойчивые, $n=11$	устойчивые + стресс, $n=8$	контроль – предрасположенные, $n=13$	предрасположенные + стресс, $n=8$
Плотность расположения клеточных элементов на единице площади (0,017 мм ²)	31,2±3,7 (24–55)	24,3±1,7 (66–75)	28,5±2,5 (23–45)	16,8±1,5 (18–63)

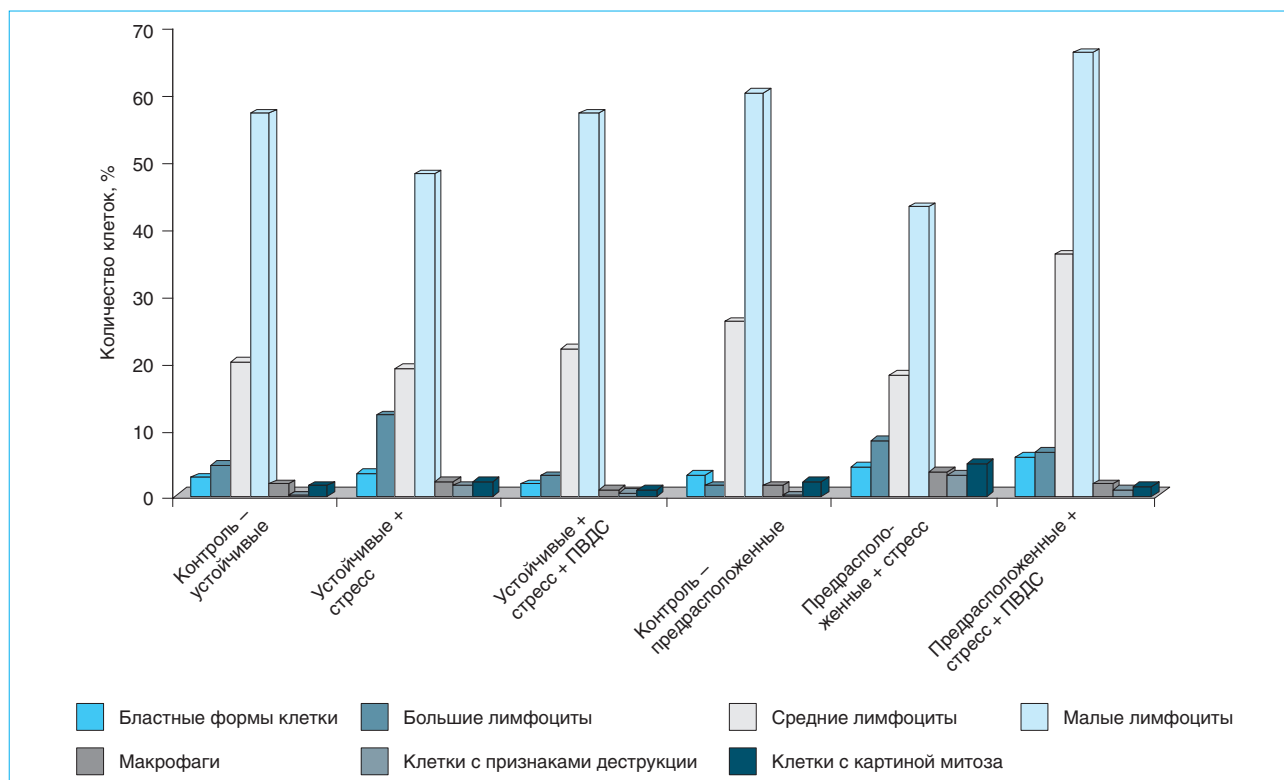


Рис. 1. Относительное содержание некоторых клеток в центрах размножения лимфоидных бляшек тонкой кишки крыс, устойчивых и предрасположенных к эмоциональному стрессу, с предварительным введением ПВДС (DSIP), %

значение рассматриваемого показателя практически не изменялось по сравнению с контролем и составило 29,5% (в контроле 31,2%). У предрасположенных крыс в тех же условиях произошло его снижение всего до 23,8% (в контроле 28,5%). Подобная реакция наблюдалась и при стрессорном воздействии с предварительным введением в организм животных семакса. Так, у устойчивых крыс значение данного показателя составляло 27,6% (в контроле 31,2%), у предрасположенных оно снизилось до 26,8% (в контроле 28,5%).

Исследование микротопографии иммунных (лимфоидных) образований тонкой кишки показало, что введение в организм ПВДС и семакса ингибирует макрофаго-пролиферативные и деструктивные процессы в функционально активных зонах лимфоидных бляшек тонкой кишки как у устойчивых, так и у предрасположенных экспериментальных групп животных. При изучении клеточного состава центров размножения лимфоидных бляшек установлено, что через 1 ч после воздействия стрессора содержание малых лимфоцитов в центрах размножения лимфоидных узелков лимфоидных бляшек у прогностически устойчивых и у предрасположенных крыс снижалось соответственно до 48% (в контроле 57%) и до 43% (в контроле 60%) – рис. 1. Выявлено увеличение числа клеток с картиной деструкции от единичных на отдельных препаратах до 1,5 и 3,2%

соответственно по сравнению с контролем. За счет увеличения деструктивных процессов отмечался рост числа макрофагов до 2,2% (в контроле 1,8%) и до 3,6% (в контроле 1,6%). Аналогичная морфологическая картина (увеличение количества макрофагов и клеток с картиной деструкции) в ответ на воздействие эмоционального стресса наблюдалась в лимфоидных узелках с центрами размножения в стенке трахеи [5].

Процентное содержание клеток с картиной митозов у устойчивых и предрасположенных крыс через 1 ч после стрессорного воздействия возрастало в центрах размножения лимфоидных бляшек до 3,2% (в контроле 1,6%) и до 4,8% (в контроле 2,2%) соответственно.

Как известно, в механизмах устойчивости к эмоциональному стрессу участвуют регуляторные пептиды мозга [11, 12, 20]. Доказано, что ПВДС и семакс обладают выраженным антистрессорным действием [1, 12, 13]. У предрасположенных к стрессу крыс в центрах размножения лимфоидных бляшек тонкой кишки после 1-часового стрессорного воздействия с предварительным введением ПВДС наблюдалось увеличение количества бластных форм клеток до 5,8% (в контроле 3,2%), больших лимфоцитов – до 6,5% (в контроле 1,5%), средних – до 36% (в контроле 26%) и малых лимфоцитов – до 66% (в контроле 60%). Без предварительного введения ПВДС в указан-

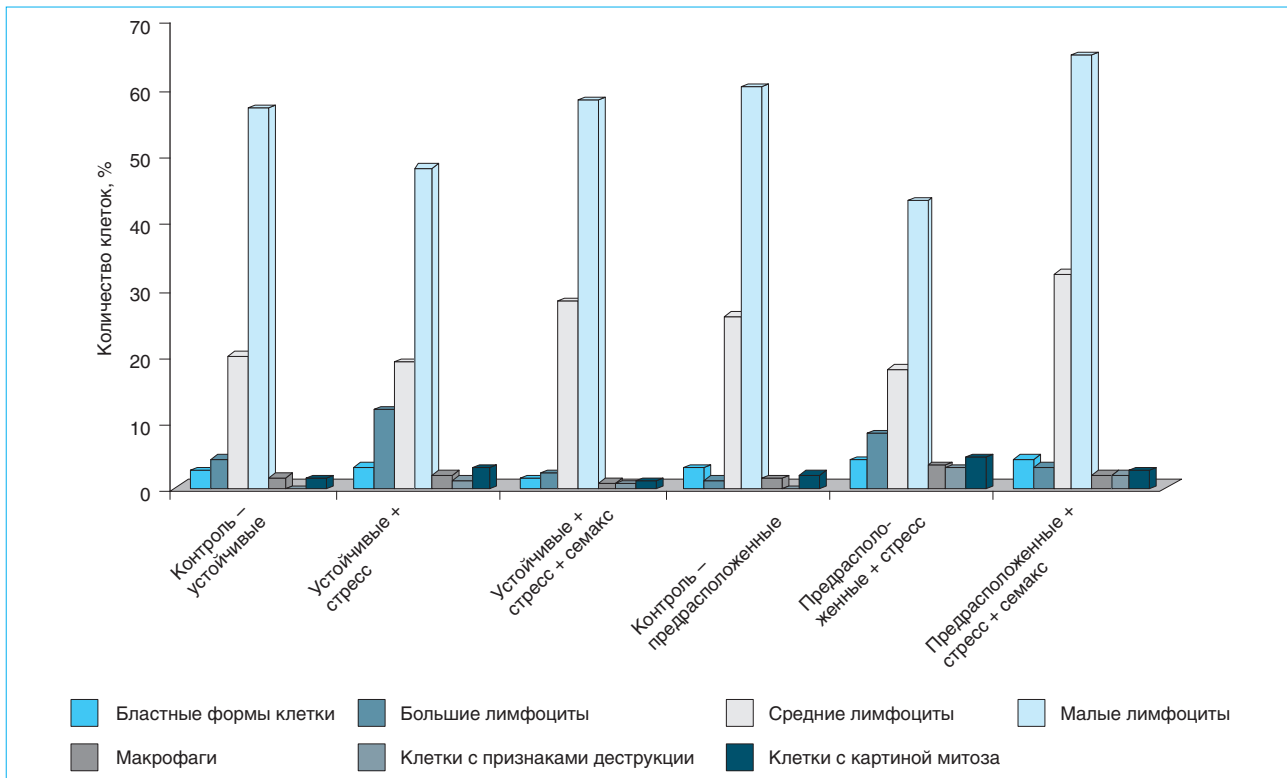


Рис. 2. Относительное содержание некоторых клеток в центрах размножения лимфоидных бляшек тонкой кишки крыс, устойчивых и предрасположенных к эмоциональному стрессу, с предварительным введением семакса (semax), %

ных центрах отмечалось некоторое уменьшение содержания малых и средних лимфоцитов по сравнению с данными контрольных групп.

У предрасположенных к стрессу крыс в центрах размножения лимфоидных бляшек тонкой кишки при введении семакса после 1-часового стрессорного воздействия наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества бластных форм клеток до 4,6% (в контроле 3,2%), больших лимфоцитов – до 3,5% (в контроле 1,5%), средних – до 32,3% (в контроле 26%) и малых лимфоцитов – до 64,8 (в контроле 60%). У стрессоустойчивых крыс выявлялась некоторая тенденция к снижению бластных форм клеток – до 1,6% (в контроле 2,8%), больших лимфоцитов – до 2,5% (в контроле 4,6%) – рис. 2. Содержание средних и малых лимфоцитов практически оставалось неизменным по сравнению с контрольной группой животных. Без предварительного введения семакса в центрах размножения лимфоидных бляшек тонкой кишки экспериментальных животных обнаруживалось некоторое уменьшение содержания клеточных элементов, указанных выше, по сравнению с контрольными показателями.

При изучении особенностей ранней реакции периферической крови на стрессорное воздействие спустя 1 ч выявлены лимфоцитопения и нейтрофильный лейкоцитоз по сравнению с данными соответствующих контрольных групп (рис. 3 и 4). Найденные отклонения согласуются с наблюде-

ниями ряда авторов [15, 16], отметивших аналогичные изменения, но в более отдаленные сроки после воздействия эмоционального стресса.

В периферической крови у крыс (как прогностически устойчивых, так и предрасположенных к ЭС) при предварительном введении ПВДС и семакса не наблюдалось лимфоцитопении и нейтрофильного лейкоцитоза по сравнению с группами крыс, испытывавших ЭС без предварительного введения этих стресспротективных олигопептидов. Так, содержание лимфоцитов после воздействия стресса с предварительным введением ПВДС у устойчивых крыс достоверно ($p < 0,05$) увеличивалось до 88,4% (в контроле 83%) – см. рис. 3. У предрасположенных крыс, испытывавших ЭС с предварительным введением ПВДС, значение данного показателя практически не изменилось и составило 86,2% (в контроле 89%). Уровень сегментоядерных нейтрофилов у этих животных также достоверно ($p < 0,05$) снизился до 3,2% (в контроле 11%). У предрасположенных крыс при тех же условиях значение данного показателя возросло незначительно – до 6,6% (в контроле 4%).

У устойчивых и предрасположенных крыс, испытывавших ЭС с предварительным введением семакса, количество лимфоцитов в периферической крови возросло до 90,3 и 91% соответственно (в контроле 83 и 89%) по сравнению с данными контрольной группы – см. рис. 4. Содержание

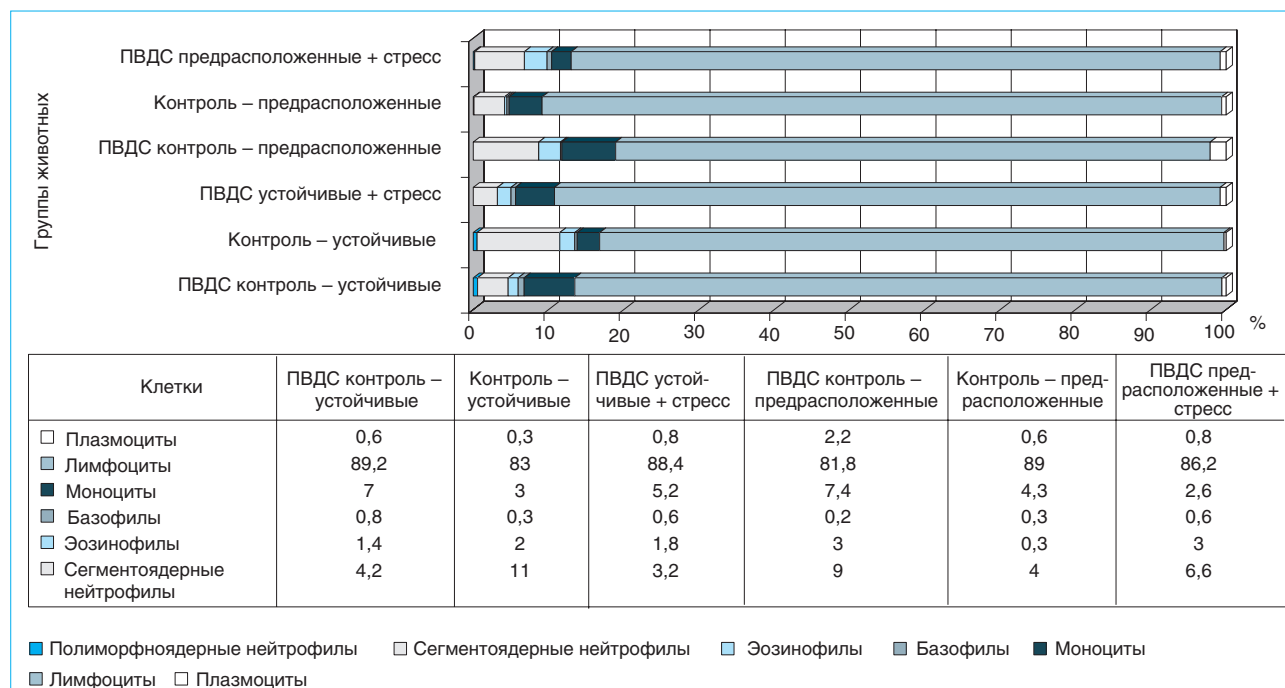


Рис. 3. Относительное содержание клеток периферической крови крыс линии Вистар с предварительным введением ПВДС (DSIP), %

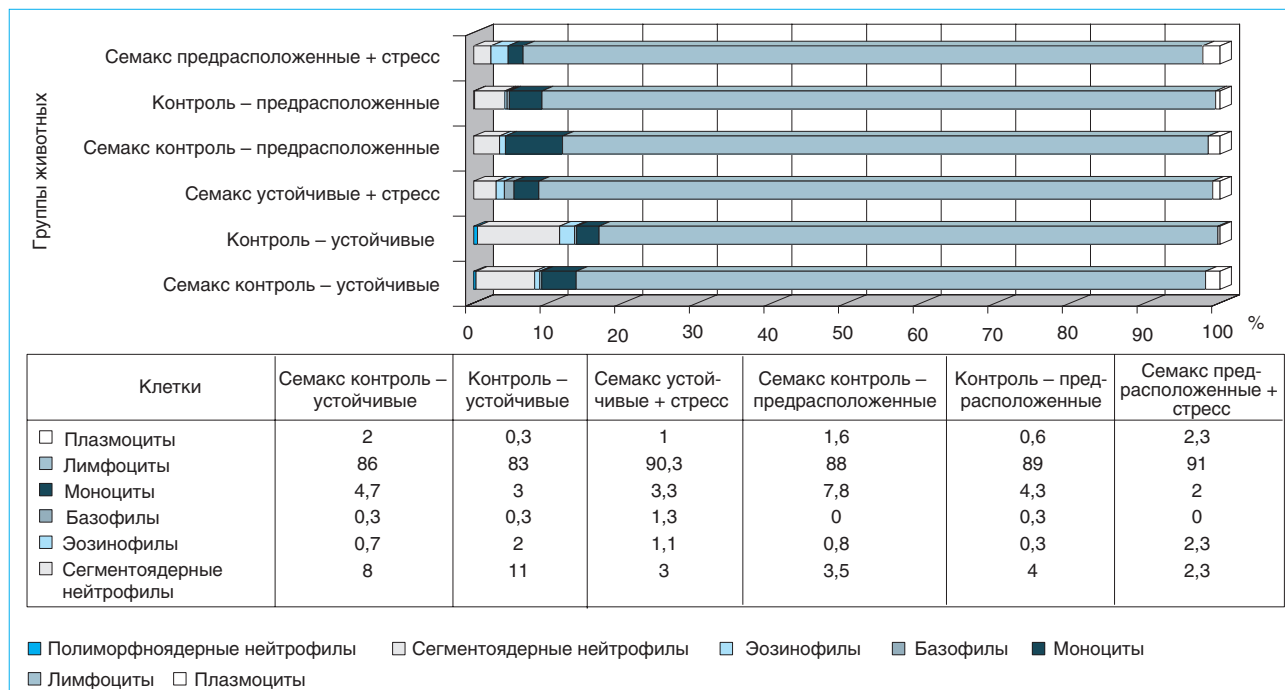


Рис. 4. Относительное содержание клеток периферической крови крыс линии Вистар с предварительным введением семакса (semax), %

сегментоядерных нейтрофилов снизилось до 3 и 2,3% (в контроле 11 и 4%).

Материалы нашего экспериментального исследования согласуются с результатами многих авторов, которые доказали, что органы иммунной системы вместе с иммунокомпетентными клетками крови способны очень быстро и тонко реагировать на изменения условий внешней среды [2, 5–8].

Выводы

Введение в организм ПВДС и семакса оказывает стресслимитирующее воздействие на макрофаго-пролиферативные и деструктивные процессы в функционально активных зонах селезенки и лимфоидных бляшек тонкой кишки. Их применение способствует снижению стресс-индуцированного

состояния клеток лимфоидного ряда в периферической крови, а также в лимфоидных структурах селезенки и лимфоидных бляшек тонкой кишки. Предрасположенные к эмоциональному стрессу крысы в большей степени реагируют на стрессорное воздействие, чем устойчивые животные.

Полученные данные позволяют оценить компенсаторные возможности органов иммунной системы при воздействии эмоционального стресса (например, при эрозиях и язвах желудка и кишечника), а также могут быть полезны в дальнейшем в практической деятельности (гастроэнтерологов, аллергологов, иммунологов) при оценке взаимосвязи иммунных механизмов с клиническими проявлениями различных заболеваний для разработки соответствующей лечебной тактики.

Опираясь на результаты экспериментальных исследований, мы полагаем, что можно рекомендовать введение ПВДС и семакса для лечения и профилактики стресс-индуцированных состояний

в качестве антистрессорного протектора при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта (в частности, эрозий и язв).

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что применение ПВДС и семакса снимает отрицательное действие перенесенного эмоционального стресса на лимфоидные структуры тонкой кишки, что, безусловно, может предотвратить негативные последствия при развитии указанных заболеваний.

Таким образом, антистрессорные препараты ПВДС и семакс, восполняя возникающий в организме дефицит эндогенных нейропротекторов, могут облегчать течение изъязвлений слизистой оболочки и рекомендуются в качестве профилактического средства при наличии факторов риска развития заболеваний желудочно-кишечного тракта (тонкой кишки), а также для лечения данных заболеваний.

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Незавибацько В.Н., Мясоедов Н.Ф. и др. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10-семакс // Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. — 1997. — Т. 47, вып. 2. — С. 420–430.
2. Клиническая иммунология и аллергология: В 3 т. — Т. 1: Пер. с нем. / Под ред. Л. Йегера. — М.: Медицина, 1990.
3. Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В. Тест «открытого поля» как прогностический критерий устойчивости к эмоциональному стрессу крыс линии Вистар // Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. — 1995. — Т. 45. — С. 775–781.
4. Куртяну Б.Н., Шептулин А.А. Язвы желудка. — Кишинев: Штиинца, 1990.
5. Морозова Е.В., Ерофеева Л.М., Коплик Е.В. Морфология и цитоархитектоника лимфоидных образований в стенках трахеи у крыс с различной восприимчивостью к эмоциональному стрессу // Вестн. новых мед. технологий. — 2007. — Т. 10, № 1. — С. 29–32.
6. Петров Р.В. Иммунология. — М.: Медицина, 1987.
7. Рабсон А., Ройт А., Делз П. Основы медицинской иммунологии: Пер. с англ. — М.: Мир, 2006.
8. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. — М.: Джангар, 2000.
9. Сапин М.Р., Этинген Л.Е. Иммунная система человека. — М.: Медицина, 1996.
10. Серов В.В., Томилина И.В., Судаков К.В. Морфофункциональная характеристика соединительной ткани при эмоциональном стрессе у крыс Август и Вистар // Бюлл. эксп. биол. мед. — 1995. — Т. 119. № 6. — С. 571–573.
11. Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. — М.: Горизонт, 1998.
12. Судаков К.В., Коплик Е.В., Ведяев Д.Ф. и др. Пептид дельта-сна как фактор, повышающий устойчивость животных к эмоциональному стрессу // ДАН СССР. — 1982. — Т. 267, № 1. — С. 230–233.
13. Умрюхин П.Е., Судаков К.В. Пептид, вызывающий дельта-сон, в механизмах устойчивости к эмоциональному стрессу: молекулярно-клеточный аспект // Тез. докл. конгресса «Прогрессивные научные технологии для здоровья человека». Кара-Дат 8–9 июня 2003 г. — С. 221–222.
14. Dominguez-Gerpe L., Rey-Mendez M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice // BMC Immunol. — 2001. — Vol. 2, N 1. — P. 7.
15. Dominguez-Gerpe L., Rey-Mendez M. Modulation of stress-induced murine lymphoid tissue involution by age, sex and strain: role of bone marrow // Mech. Ageing Dev. — 1998. — Vol. 104, N 2. — P. 195–205.
16. Fleshner M., Nguyen K.T., Cotter C.S. et al. Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity // Am. J. Physiol. — 1998. — Vol. 275, N 3. — P. 870–878.
17. Fukui Y., Sudo N., Yu X.N. et al. The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production // J. Neuroimmunol. — 1997. — Vol. 79, N 2. — P. 211–217.
18. Kim H., Shin M.S., Kim S.S. et al. Modulation of immune responses by treadmill exercise in Sprague-Dawley rats // J. Sports Med. Phys. Fitness. — 2003. — Vol. 43, N 1. — P. 99–104.
19. Rosh P.J. Stress, the immune system and psychiatry. — New-York, 1995.
20. Saravia F., Padros M.R., Ase A. et al. Differential response to a stress stimulus of proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats // Neuropeptides. — 1998. — Vol. 32, N 4. — P. 351–359.