

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕЗЕНКИ ПОТОМСТВА САМОК МЫШЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ, ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ

ОБЕРНИХИН С.С.

CHANGES OF SPLENIC MORPHOLOGY IN OFFSPRING OF MURINE DAMS EXPOSED TO STIMULATION OF THE IMMUNE SYSTEM IN EARLY PREGNANCY IN SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

OBERNIKIN S.S.

Лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии (зав. лабораторией – профессор М.Н. Болтовская) и развития эндокринной системы (зав. лабораторией – д.м.н. Н.В. Яглова) ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, г. Москва.

В ранние сроки беременности, через 24 и 48 чч после введения липополисахарида *E. coli*. Выявлена менее выраженная реакция селезенки потомства при развитии системного воспалительного ответа, связанная с замедлением ее развития как органа иммунной системы. Происходило нарушение кооперации клеток в маргинальной зоне, обусловленное отсутствием нейтрофилов, и замедление гиперпластических процессов в белой пульпе на фоне усиленного выделения секреторного материала тучными клетками.

Ключевые слова: селезенка, пренатальное воздействие, конканавалин А, липополисахарид

V rannie sroki beremennosti, cherez 24 i 48 chch posle vvedeniya lipopolisaharida *E. coli*. Vyjavlena menee vyrazhennaja reakcija selezenki potomstva pri razvitii sistemnogo vospalitel'nogo otveta, svjazannaja s zamedleniem ee razvitija kak organa immunnoj sistemy. Proishodilo narushenie kooperacii kletok v marginal'noj zone, obuslovennoe otsutstviem nejtrofilov, i zamedlenie giperplasticheskikh processov v beloju pul'pe na fone usilennogo vydelenija sekretornogo materiala tuchnymi kletkami.

Kljuchevye slova: selezenka, prenatal'noe vozdejstvie, konkanavalin A, lipopolisaharid

In early pregnancy 24 and 48 hh after endotoxin exposure were studied. Changes in spleen morphology caused by systemic inflammatory response showed attenuated reaction mainly because of retardation of white splenic pulp development. Prenatally exposed mice showed lesser hyperplasia of white splenic pulp, impaired cooperation of cells in marginal zone because of strong deficit of neutrophils and more intensive degranulation of mast cells.

Key words: *spleen, prenatal exposure, concanavalin A, lipopolysaccharide*

Введение. Одним из наименее изученных аспектов развития и функционирования иммунной системы являются последствия пренатального воздействия, оказанного на материнский организм на ранних сроках беременности. Имеются данные, что состояние иммунной системы матери во время беременности может “программировать” развитие иммунной и других систем потомства не только в пре-, но и постнатальном периодах [9, 12]. Это может быть причиной разнообразных нарушений функционирования иммунной системы. Целью настоящего исследования было изучение морфофункциональных изменений селезенки потомства мышей, перенесших воздействие на иммунную систему в ранние сроки беременности, при развитии системного воспалительного ответа (СВО).

Цель исследования — изучение морфофункциональных изменений селезенки потомства самок мышей C57BL/6, перенесших активацию иммунной системы конканавалином.

Материал и методы исследования. Эксперименты проводили на 38 самцах мышей C57BL/6 в возрасте 2,5 недель. Самцы опытной группы (n=21) получены от самок, которым на 7-е сутки после оплодотворения, то есть до формирования органов иммунной системы плода, был однократно введен Т-клеточный митоген конканавалин А (Кон А) в орбитальный синус в дозе 5мг/кг, не вызывающей развитие гепатита [1]. В качестве контрольной группы использовали самцов мышей C57/BL6 (n=17), родившихся от самок, которым вводили в орбитальный синус аналогичный объем физиологического раствора. Часть мышей опытной (n=8) и контрольной групп (n=6) была выведена из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Оставшимся животным обеих групп однократно вводили LD50 (15 мг/кг) липополисахарида (ЛПС) *E. coli* штамм

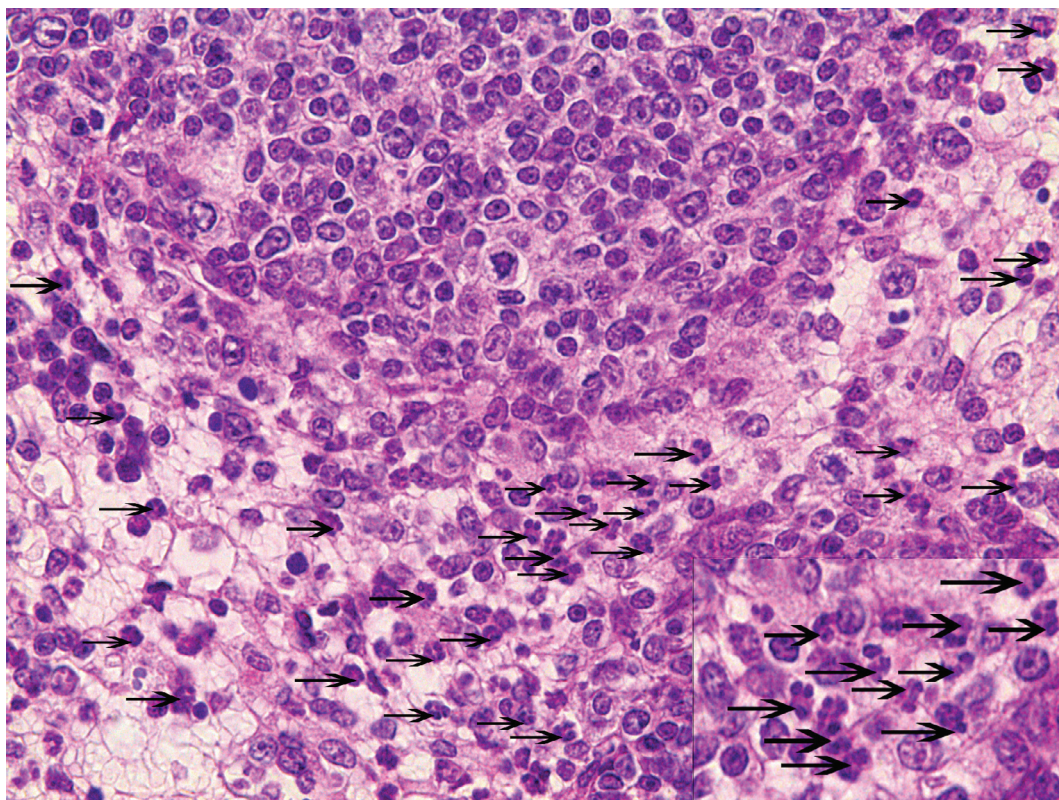


Рис. 1а. Изменения в маргинальной зоне селезенки через 24 часа после введения ЛПС. Мыши контрольной группы. В маргинальной зоне высокое содержание нейтрофилов (указаны стрелками, на врезке увеличенный фрагмент маргинальной зоны). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

O111:B4 («Difco», США) внутривенно и через 24 и 48 ч выводили из эксперимента. Проводили морфологическое исследование селезенки до и после введения ЛПС. Определяли относительную массу селезенки, проводили исследование гистологических препаратов селезенки методом световой микроскопии и компьютерной морфометрии с помощью программы «ImageScope» («Leica Microsystems GmbH», Австрия). В препаратах селезенки, окрашенных гематоксилином и эозином, определяли долю белой пульпы, ширину маргинальной зоны, количество лейкоцитов в ней, количество гемопоэтических мононуклеарных клеток в мм² площади красной пульпы. В препаратах, окрашенных толуидиновым синим, определяли количество выявляемых тучных клеток в мм² среза, их средний гистохимический коэффициент (СГК), отражающий насыщенность тучных клеток секреторным материалом по Н.В. Ягловой [5], и индекс дегрануляции (ИД) как отношение числа дегранулирующих тучных клеток к их общему количеству. Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 7.0 («Statsoft», США). Сравнение групп по количественному признаку проводили с помощью критериев Стьюдента, Манна-Уитни. Различия

считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Селезенка мышей контрольной группы до введения ЛПС имела типичное строение. Белая пульпа занимала четвертую часть объема органа. В лимфатических узелках начинала формироваться периартериальная зона. Маргинальная зона была хорошо выражена, большинство клеток в ней составляли лимфоциты, также выявлялись нейтрофилы и макрофаги (табл.). Красная пульпа была обильно заселена клетками (табл.). Встречались лейкоциты, большое количество бластов, мегакариоцитов, а также единичные тучные клетки с низким содержанием секреторных гранул (табл.).

У мышей опытной группы селезенка имела немного меньшую относительную массу и долю белой пульпы (табл.). В лимфатических узелках селезенки периартериальная, герминативная и мантийная зоны не различались. Ширина маргинальной зоны была статистически значимо меньшей. Количество клеток в ней и в красной пульпе превышало значения контрольной группы, но численность нейтрофилов была понижена (табл.). Отмечалось значительное увеличение количества тучных клеток по сравнению с контрольной группой (табл.). Они находились не только в красной

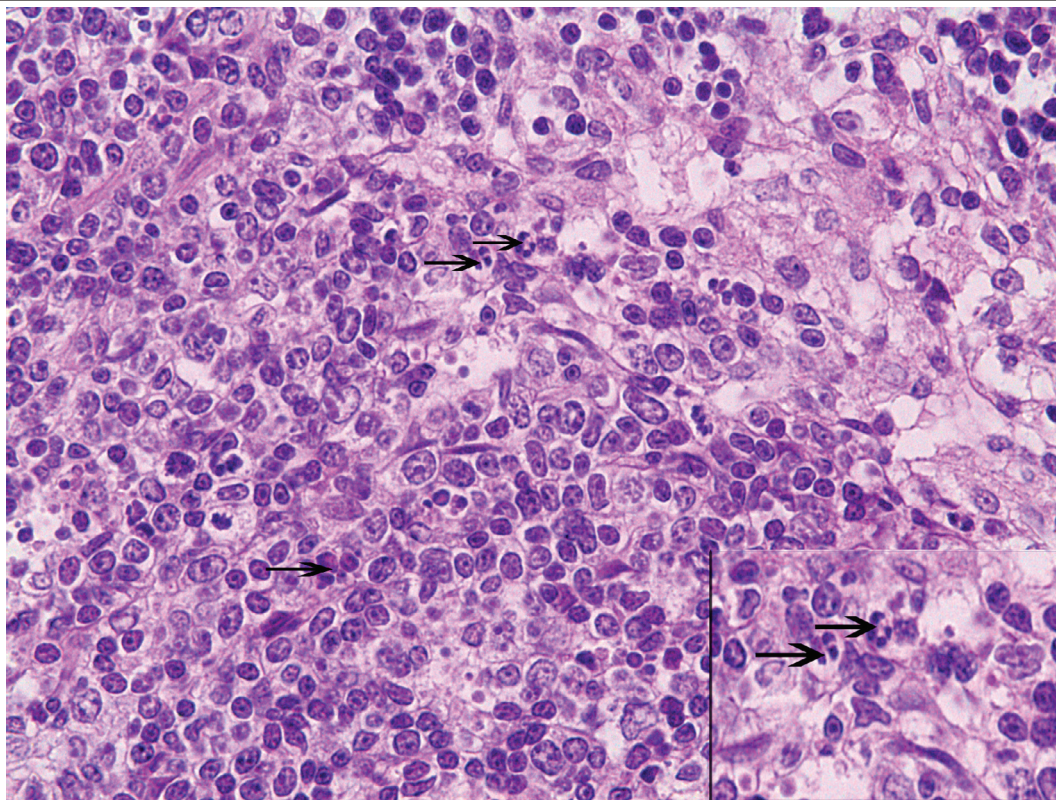


Рис. 16. Изменения в маргинальной зоне селезенки через 24 часа после введения ЛПС. Мыши опытной группы. Количество клеток в маргинальной зоне больше, нейтрофилы встречаются крайне редко (на врезке увеличенный фрагмент маргинальной зоны). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

пульпе, но и в маргинальной зоне. Насыщенность тучных клеток секреторным материалом почти в два раза превышала значения контрольной группы. Дегранулирующие клетки не выявлялись (табл.).

Развитие СВО после введения ЛПС приводило к гибели 63,7% мышей контрольной и 30,8% мышей опытной групп. Через 24 и 48 часов после введения ЛПС у мышей контрольной группы происходило прогрессирующее увеличение относительной массы селезенки, доли белой пульпы и уменьшение ширины маргинальной зоны (табл.). Через 24 часа в лимфатических узелках появились апоптотически измененные лимфоциты с пикнотизированными и фрагментированными ядрами. В маргинальной зоне общее количество лейкоцитов уменьшалось, но резко увеличивалось процентное содержание нейтрофилов (табл., рис. 1а). Количество гемопоэтических клеток и клеток крови в красной пульпе также значительно уменьшалось, а доля нейтрофилов увеличивалась. В красной пульпе выявлялись тучные клетки с высокой насыщенностью секреторным материалом (табл.). Наблюдалось расширение венозных сосудов. Просветы сосудов были заполнены плазмой. В некоторых сосудах появлялись нити фибрина. Через

48 часов после введения ЛПС количество клеток в маргинальной зоне не претерпело количественных изменений, но наблюдалось значительное снижение содержания нейтрофилов. В красной пульпе количество клеток также не изменялось, отмечалось уменьшение количества нейтрофилов. Тучные клетки не выявлялись (табл.). Расширения кровеносных сосудов красной пульпы не наблюдалось. Отмечалось неравномерное кровенаполнение сосудов.

При исследовании селезенки мышей опытной группы через 24 часа после введения ЛПС выявлены увеличение размера и массы органа и доли белой пульпы аналогичное таковому в контрольной группе (табл.). В герминативных центрах апоптоз лимфоцитов был более выражен. Общей чертой было и уменьшение ширины маргинальной зоны лимфатических узелков и количества клеток в ней, но, тем не менее, последний показатель превышал значения контрольной группы. Также отличием был состав клеток в маргинальной зоне. Нейтрофилы в ней практически отсутствовали (табл., рис. 1б). Количество клеток в красной пульпе уменьшилось, но превышало значения контрольной группы. Нейтрофильные гранулоциты в красной пульпе встречались крайне редко (табл.).

Таблица.

Морфофункциональные характеристики селезенки мышей контрольной и опытной групп в разные сроки после введения LD₅₀ ЛПС (M±m)

Морфологические показатели	До введения ЛПС	Через 24ч после введения ЛПС	Через 48ч после введения ЛПС
Относительная масса селезенки, % Контрольная группа Опытная группа	0,64±0,06 0,57±0,04	0,72±0,06# 0,71±0,06#	0,97±0,08■ 0,64±0,05*
Доля белой пульпы, % Контрольная группа Опытная группа	26,59±4,66 19,62±2,75*	30,74±0,035# 26,61±1,28*#	42,38±3,25■ 30,45±2,33*
Ширина маргинальной зоны, мкм Контрольная группа Опытная группа	60,72±3,51 45,55±6,35*	36,76±2,27# 34,63±1,73#	25,0±1,75■ 21,97±1,91■
Количество клеток в мм ² среза маргинальной зоны Контрольная группа Опытная группа	21375,0±781,2 29652,5±868,9*	9922,5±1256,5# 19468,3±5522,0*#	9290,0±461,5 11802,5±787,8■
% нейтрофилов от общего количества клеток в маргинальной зоне Контрольная группа Опытная группа	1,04±0,05 0,13±0,01*	20,15±2,57# 0,63±0,27*#	3,41±0,31■ 0*
Количество клеток в мм ² красной пульпы Контрольная группа Опытная группа	24175,0±803,3 27275,0±1076,2*	11391,4±450,4# 18144,4±491,0*#	11252,9±1224,9 14362,5±602,1*■
% нейтрофилов от общего количества клеток в красной пульпе Контрольная группа Опытная группа	0,27±0,02 0,09±0,005*	6,28±0,89# 0,98±0,17*#	2,65±0,54■ 0,21±0,09*■
Количество тучных клеток в мм ² площади среза селезенки Контрольная группа Опытная группа	0,92±0,31 5,49±0,25*	0,49±0,15 0,55±0,11#	0 1,02±0,36*
Средний гистохимический коэффициент тучных клеток Контрольная группа Опытная группа	0,75±0,04 1,46±0,06*	2,23±0,23# 2,67±0,33#	— 1,88±0,12■
Индекс дегрануляции тучных клеток Контрольная группа Опытная группа	0 0	0 33,33±2,50*#	— 0■

Примечания: * - статистически значимые различия между опытной и контрольной группами; # - между значениями до введения ЛПС и через 24ч после введения ЛПС; ■ - между значениями через 24ч после введения ЛПС и через 48ч после введения ЛПС.

Количество выявляемых тучных клеток значительно уменьшилось и не отличалось от значений контрольной группы. Треть тучных клеток выделяла секреторный материал путем дегрануляции (табл.). Наблюдалось расширение кровеносных сосудов, в просвете единичных сосудов выявля-

лись нити фибрина и незначительное количество форменных элементов. Через 48 часов после введения ЛПС масса селезенки мышей уменьшилась в отличие от контрольной группы и не отличалась от значений до введения ЛПС (табл.). Доля белой пульпы немного увеличилась, но была

меньше, чем в контрольной группе. Ширина маргинальной зоны уменьшилась и не отличалась от значений контрольной группы. Количество клеток в маргинальной зоне также уменьшилось, но было больше, чем в контрольной группе, нейтрофилы не выявлялись. Наблюдалось прогрессирующее опустошение красной пульпы. В отличие от контрольной группы нейтрофилов в ней выявлялось крайне мало, но встречались немногочисленные тучные клетки с пониженным содержанием секреторных гранул (табл.).

Считается, что нарушение цитокинового баланса во время беременности может привести к изменениям иммунной системы потомства в виде аутоиммунных и аллергических реакций [8]. Нами ранее было показано, что у потомства, перенесшего цитокиновый шторм в пренатальном периоде после введения Кон А, в постнатальном периоде в селезенке медленнее увеличивается доля белой пульпы, а повышенное количество гемопоэтических клеток и тучных клеток в красной пульпе сохраняется, что свидетельствует о задержке превращения селезенки из органа кроветворения в орган иммунной системы [4]. Эти выводы подтверждаются литературными данными о нарушениях развития селезенки потомства при инфекционном процессе у беременных самок, сопровождавшемся повышением секреции провоспалительных цитокинов [11]. Смертность животных опытной группы при развитии СВО была меньшей. Морфофункциональные изменения в селезенке были схожи с изменениями у мышей контрольной группы, но были менее выражены. Существенного увеличения количества нейтрофилов в маргинальной зоне не происходило ни через 24, ни через 48ч после введения ЛПС. Известно, что миграция нейтрофилов в селезенку начинается в эмбриональном периоде и продолжается после рождения особи, что связано с колонизацией кишечника микрофлорой и поступлением ЛПС в системный кровоток [6]. Попадание антигенов в организм усиливает миграцию нейтрофилов в маргинальную зону селезенки, где они трансформируются в В-клеточные хелперные нейтрофилы. Синтезируемые ими В-стимулирующие молекулы инициируют антиген-независимую секрецию иммуноглобулинов В-клетками маргинальной зоны [7]. В настоящее время в литературе широко обсуждается вопрос о так называемых нейтрофильных внеклеточных ловушках, индуцируемых ЛПС посредством связывания с толл-подобными рецепторами [11]. Считается, что они играют важную роль в защите от различных патогенов. Введение большой дозы ЛПС вызывает активацию нейтрофилов, запуск СВО, эндотоксиновый шок и гибель организма. Таким образом, снижение миграции нейтрофилов в маргинальную зону и

красную пульпу может приводить к снижению реактивности иммунной системы на ЛПС. Также особенностью изменений в селезенке было резкое снижение количества тучных клеток непропорциональное уменьшению общего количества клеток в красной пульпе. Тучные клетки являются активными участниками реакций врожденного иммунитета и модуляторами реакций адаптивного иммунитета [2,4]. Наблюдавшееся после введения ЛПС усиленное выделения ими секреторного материала дегрануляцией возможно было направлено на компенсацию недостаточной миграции и функции нейтрофилов и являлось особенностью функционирования иммунной системы у мышей опытной группы.

Таким образом, стимуляция иммунной системы материнского организма на ранних сроках беременности до начала формирования органов иммунной системы плода приводит к менее выраженной реакции селезенки потомства при развитии системного воспалительного ответа, что связано с отставанием ее развития как органа иммунной системы. Отличием морфофункциональных изменений селезенки является нарушение кооперации клеток в маргинальной зоне, обусловленной отсутствием миграции нейтрофилов, усиленный апоптоз лимфоцитов и замедление гиперпластических процессов в белой пульпе, а также усиленное выделение секреторного материала тучными клетками.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Динамика морфофункциональных изменений органов иммунной системы мышей Balb/c при экспериментальном гепатите / С.С. Обернихин [и др.] // Бюлл. exper. биол. – 2006. – Т. 141. – №4. – С.451-454.
2. Яглова Н.В. Биология секреции тучных клеток / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – №4. – С.4-10.
3. Яглова Н.В. Регуляторная роль тучных клеток в морфогенетических процессах органов иммунной системы потомства мышей, перенесших активацию иммунной системы в ранние сроки беременности / Н.В. Яглова, С.С. Обернихин // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2013. – №2. – С.62-67.
4. Яглова Н.В. Тучные клетки и врожденный иммунитет / Н.В. Яглова // Иммунология. – 2009. – Т.30. – №2. – С. 139-143.
5. Яглова Н.В. Цитофизиологические особенности популяции тучных клеток щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова // Морфологические ведомости. – 2008. – № 3-4. – С.94-98.
6. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal

zone of the spleen / I. Puga, [et al.] // *Nature Immunology*. – 2012. – Vol. 13. – P. 170-180.

7. Cerutti A. New helping friends for B-cells / A. Cerutti, I. Puga, M. Cols // *European Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 42. – N. 8. – P. 1965-1958.

8. Early human pregnancy serum cytokine levels predict autoimmunity in offspring / S. Lindehammer, [et al.] // *Autoimmunity*. – 2011. – Vol. 44. – N. 6. – P. 445-52.

9. Lacroix M. Maternal/fetal determinants of insulin resistance in women during pregnancy and in offspring over life / M. Lacroix, E. Kina, M.-F. Hivert // *Current Diabetes Reports*. – 2013. – Vol. 13. – N. 2. – P. 238-244.

10. Maternal protein deficiency during a gastrointestinal nematode infection alters developmental profile of lymphocyte populations and selected cytokines in neonatal mice / M. Odier [et al.] // *Journal of Nutrition*. – 2013. – Vol. 143. – N. 1. – P. 100-107.

11. Papayannopoulos V. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky // *Journal Cell. Biology*. – 2010. – Vol. 191. – N. 3. – P. 677-691.

12. Placental-mediated increased cytokine response to lipopolysaccharides: a potential mechanism for enhanced inflammation susceptibility of the preterm fetus / J. Boles, [et al.] // *J. Inflamm. Res.* – 2012. – N. 5. – P. 97-75.

REFERENCES:

1. Dinamika morfofunkcional'nyh izmenenij organov immunoj sistemy myshej Balb/c pri jeksperimental'nom gepatite / S.S. Obernihin [i dr.] // *Bjull. jeksper. biol.* – 2006. – T. 141. – №4. – S. 451-454.

2. Yaglova N.V. *Biologija sekrecii tuchnyh kletok* / N.V. Yaglova, V.V. Yaglov // *Klinicheskaja i jeksperimental'naja morfologija*. – 2012. – №4. – S. 4-10.

3. Yaglova N.V. *Reguljatornaja rol' tuchnyh kletok v morfogeneticheskijh processah organov immunoj sistemy potomstva myshej, perenessih aktivaciju immunoj sistemy v rannije sroki beremennosti* / N.V. Yaglova, S.S. Obernihin // *Klinicheskaja i jeksperimental'naja morfologija*. – 2013. – №2. – S. 62-67.

4. Yaglova N.V. *Tuchnye kletki i vrozhdennyj immunitet* / N.V. Yaglova // *Immunologija*. – 2009. – T. 30. – №2. – S. 139-143.

5. Yaglova N.V. *Citofiziologicheskie osobennosti populjacji tuchnyh kletok shhitovidnoj zhelezy pri vozdejstvii lipopolisaharida* / N.V. Yaglova // *Morfologicheskie vedomosti*. – 2008. – № 3-4. – S. 94-98.

6. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen / I. Puga, [et al.] // *Nature Immunology*. – 2012. – Vol. 13. – P. 170-180.

7. Cerutti A. New helping friends for B-cells / A. Cerutti, I. Puga, M. Cols // *European Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 42. – N. 8. – P. 1965-1958.

8. Early human pregnancy serum cytokine levels predict autoimmunity in offspring / S. Lindehammer, [et al.] // *Autoimmunity*. – 2011. – Vol. 44. – N. 6. – P. 445-52.

9. Lacroix M. Maternal/fetal determinants of insulin resistance in women during pregnancy and in offspring over life / M. Lacroix, E. Kina, M.-F. Hivert // *Current Diabetes Reports*. – 2013. – Vol. 13. – N. 2. – P. 238-244.

10. Maternal protein deficiency during a gastrointestinal nematode infection alters developmental profile of lymphocyte populations and selected cytokines in neonatal mice / M. Odier [et al.] // *Journal of Nutrition*. – 2013. – Vol. 143. – N. 1. – P. 100-107.

11. Papayannopoulos V. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky // *Journal Cell. Biology*. – 2010. – Vol. 191. – N. 3. – P. 677-691.

12. Placental-mediated increased cytokine response to lipopolysaccharides: a potential mechanism for enhanced inflammation susceptibility of the preterm fetus / J. Boles, [et al.] // *J. Inflamm. Res.* – 2012. – N. 5. – P. 97-75.

Авторская справка:

Обернихин Сергей Станиславович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН; 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, 3, (499)-120-80-65, E-mail: ober@mail.ru