

Топол И.А., Камышный А.М.

Закономерности и направленность изменений в иммунной системе кишечника в условиях хронического социального стресса

Запорожский государственный медицинский университет, 69035, Украина, г.Запорожье, проспект Маяковского, д. 26

Исследовано влияние хронического социального стресса на распределение TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Rorγt⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-лимфоцитов в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани. **Цель исследования.** Изучить особенности распределения TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Rorγt⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-лимфоцитов в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс в условиях ХСС. **Методика.** Исследования проводились на 60 крысах (самки) Вистар, которые были разделены на 3 экспериментальные группы: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках с ежедневной сменой группировки (группа 3). Структуру популяции TLR2⁺-, TLR4⁺-, Nf-κB⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Rorγt⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺- и XBP1⁺-клеток было изучено путем анализа серийных гистологических срезов с использованием метода прямой и непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител к TLR2, TLR4, Nf-κB, T-bet, GATA3, Rorγt, Foxp3, LMP2 и XBP1. **Результаты.** Установлено, что развитие ХСС приводит к значительной активации врожденной иммунной системы и сопровождается дисбалансом T-bet⁺/GATA3⁺- и Foxp3⁺/Rorγt⁺-клеток, свидетельствуя о доминировании Th1- и Th17-дифференцировки и повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике. Кроме того, показано, что на фоне хронического социального стресса развивается иммунопротеасомный дефект и стресс эндоплазматического ретикулума, который сопровождается однонаправленной тенденцией по увеличению общего количества LMP2⁺-лимфоцитов и снижению количества XBP1⁺-клеток, а изменение концентрации LMP2 и XBP1 в иммунных клетках зависит от вида стресса. **Заключение.** Полученные результаты показали, что хронический социальный стресс может выступать в роли триггера развития воспалительных и АИЗ.

Ключевые слова: стресс, КАЛТ, TLR, T-хелперы, T_{reg}, LMP2 и XBP1

Для корреспонденции: Топол Инна Александровна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ, e-mail: innatopol@yandex.ua

Для цитирования: Топол И.А., Камышный А.М. Закономерности и направленность изменений в иммунной системе кишечника в условиях хронического социального стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 34–38.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.06.15

Топол И.А., Камышный А.М.

Regularities and direction of change in the gut immune system in conditions of chronic social stress

Zaporozhye State Medical University, 26, avenue Mayakovsky, Zaporozhye, 69035, Ukraine

Investigated the influence of chronic social stress (CSS) on the distribution of TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Rorγt⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue. **The purpose.** Identify the features of the distribution of TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Rorγt⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺ lymphocytes in the gut-associated lymphoid tissue of rats with CSS. **Methods.** Researches have been conducted on 60 rats (female) of Wistar line, which were divided on 3 experimental groups: control rats (group 1); rats, which were modeled CSS1 by means of three weeks social isolation and prolong psychoemotional influence (group 2); rats, which having CSS 2 modeling by means of keeping animals in over populated cages with every day change of grouping (group 3). Structure of population of TLR2⁺-, TLR4⁺-, Nf-κB⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Rorγt⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺ — and XBP1⁺ — cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of direct and indirect

immunofluorescence with monoclonal antibodies to TLR2, TLR4, Nf- κ B, T-bet, GATA3, Ror γ t, Foxp3, LMP2 and XBP1. **Results.** It has been established that the CSS development leads to a significant activation of the innate immune system and accompanied by an imbalance of T-helper subsets in GALT, leads to an increase in ratio of T-bet⁺/GATA3⁺ and reduce Foxp3⁺/Ror γ t⁺ cells, indicating dominance Th1- and Th17-differentiation in conditions of CSS and raising the level of pro-inflammatory signaling in the gut. In addition, it has been shown that on the background of chronic social stress develops immunoproteasomny defect and endoplasmic reticulum stress, which is accompanied by a unidirectional trend to increase the total number of LMP2⁺ lymphocytes and reduce the total number of XBP1⁺ cells, and the concentration change LMP2 and XBP1 immune cells depends on the type of stress. **Conclusion.** The results showed that chronic social stress may be one of the triggers for development of inflammatory and AID.

Keywords: stress, GALT, TLR, T-helper cells, T_{reg}, LMP2, XBP1

For citation: Topol I.A., Kamyshny A.M. Regularities and direction of change in the gut immune system in conditions of chronic social stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 34–38. (in Russ).

For correspondence: Inna A. Topol, e-mail: innatopol@yandex.ua

Funding. The study had no sponsorship.

Received 15.06.15

Введение

В условиях длительной социально-экономической нестабильности и высокого уровня социального напряжения в обществе как никогда остро стоит вопрос влияния хронического социального стресса (ХСС) на здоровье индивидуума. В свою очередь, риск развития инфекционных, хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний (АИЗ) обусловлен стресс-индуцированной иммунной дисрегуляцией [1]. Так, ХСС является патогенетическим фактором развития многих социально-значимых заболеваний, включая сахарный диабет 1 типа и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), в механизмах развития которых, в свою очередь, важную роль играют нарушения экспрессии паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета TLR2/4, а также дисбаланс Th1/Th2 и T_{reg}/Th17-клеток. Тонкий кишечник является одним из основных мест генерации индуцибельных T_{reg}-клеток (iT_{reg}) и резервуаре пула Th17-клеток, так как именно здесь происходит индукция их дифференцировки из наивных T-лимфоцитов с участием кишечной микрофлоры [2-4]. Ключевыми регуляторами образования Th1, Th2 и Th17 являются транскрипционные факторы T-bet, GATA3 и Ror γ t, нокаут по генам которых (*TBX21*, *GATA3* и *ROR γ t*) блокирует развитие соответствующих лимфоцитов [5, 2]. Дифференцировка T_{reg}-клеток, в свою очередь, зависит от экспрессии транскрипционного фактора Foxp3. Трансдукция Foxp3 в не регуляторные Foxp3-CD25CD4⁺ «наивные» T-клетки человека или мышей присваивает последним функциональные свойства и фенотип T_{reg} [3]. Кроме того, важную роль в функционировании адаптивного звена иммунитета в условиях ХСС играют иммунные протеасомы и система ответа на несвернутые белки (un-

folded protein response — UPR). В частности, иммунная протеасома LMP2 принимает участие в образовании антигенных эпитопов из собственных и чужеродных белков, их презентации вместе с молекулами MHC-II классов T-лимфоцитам, а транскрипционный фактор XBP1 является одним из ключевых участников UPR при стрессе эндоплазматического ретикулума (СЭР).

Цель исследования — выявление особенностей распределения TLR2⁺/4⁺, NF- κ B⁺, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Ror γ t⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-лимфоцитов в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) крыс в условиях ХСС.

Методика

Исследования проведены на 60 самках крыс Wistar. Животные были разделены на 3 экспериментальные группы [6]: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (ПЭВ), предпологававший 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 ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках (20 крыс на клетку) в течение 3 нед. с ежедневной сменой группировки, при котором подопытную самку каждый день помещали в новую сбалансированную и перенаселенную колонию (группа 3) [7].

Структуру популяции TLR2⁺/4⁺, NF- κ B⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, Ror γ t⁺-, Foxp3⁺-, LMP2⁺-, XBP1⁺-клеток изучали на основании анализа серийных

гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Серийные 5-микронные срезы подвздошной кишки после депарафинизации и регидратации отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (рН = 7,4) и окрашивали реактивами с первичными моноклональными антителами (МКАТ) к соответствующим антигенам крысы (SantaCruzBiotechnology, США) в течение 18 ч во влажной камере при 4°C. После отмывания избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 мин при 37°C с вторичными антителами (SantaCruzBiotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной микроскопии. Препараты 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 флуоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих TLR2/4, NF-κB, T-bet, GATA3, Rorγt, Foxp3, LMP2 и XBP1. Рассчитывались морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток. При окраске МКАТ исследовали TLR2⁺/4⁺, NF-κB⁺, T-bet⁺, GATA3⁺, Rorγt⁺, Foxp3⁺, LMP2⁺ и XBP1⁺- 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).

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

Установлено, что развитие ХСС сопровождалось увеличением общего количества лимфоцитов, экспрессирующих TLR 2-го и 4-го типа в КАЛТ крыс, наиболее выраженным в ЗЛВ (TLR2⁺-лимфоциты), приводило к возрастанию числа Nf-κB⁺-клеток: в ЗЛВ в 1,8—2 раза (p<0,05); в СЭЗ — на 52—91% (p<0,05); а также влияло на плотность TLR2, TLR4 и концентрацию Nf-κB в иммуноцитах (рисунок). Изучение баланса между TLR2⁺/TLR4⁺-лимфоцитами в КАЛТ свидетель-

ствовали, что развитие ХСС приводило к достоверному росту соотношения TLR2⁺/TLR4⁺-клеток в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс с преобладанием популяции TLR2⁺-лимфоцитов. Так, коэффициент распределения TLR2⁺/TLR4⁺-клеток увеличился в ЗЛВ на 97% (p<0,05) в случае ХСС1 и на 66% (p<0,05) при ХСС2; в СЭЗ — на 39% (p<0,05) при ХСС1 и на 41% (p<0,05) в случае ХСС2, по сравнению с контролем. Данные показывают, что ХСС приводит к значительной активации врожденной иммунной системы и усилению провоспалительной сигнализации в КАЛТ. Это, в свою очередь, может влиять на уровень включения адаптивного иммунного ответа и характер дифференцировки субпопуляций Т-лимфоцитов и, в конечном итоге, инициировать развитие воспалительных заболеваний кишечника и аутоиммунных заболеваний (АИЗ).

Подтверждением этого предположения стали данные о том, что развитие стресса сопровождается увеличением количества T-bet⁺ клеток (рис.) в обеих исследуемых нами зонах КАЛТ на 39—92% (p<0,05), GATA3⁺-лимфоцитов в ЗЛВ (на 61—74%, p<0,05), уменьшает плотность Th2 в СЭЗ при ХСС1 (на 21%, p<0,05), преимущественно повышает концентрацию T-bet и GATA3 в лимфоцитах.

Развитие ХСС не влияло на соотношение T-bet⁺/GATA3⁺-клеток в ЗЛВ подвздошной кишки крыс и приводило к статистически значимому повышению данного коэффициента в СЭЗ (на 75% (p<0,05) при ХСС1 и на 46% (p<0,05) в случае ХСС2) по сравнению с контролем. Выявленные изменения экспрессии T-bet и GATA-3 и, соответственно, баланса Th1/Th2-клеток в условиях ХСС могут существенно влиять на риск развития иммунопатологии, и данный факт был подтвержден рядом других экспериментальных исследований. Так, было установлено, что развитие ХСС у мышей сопровождается дисбалансом Th1/Th2-клеток в периферических лимфатических узлах в сторону превалирования Th1 и приводит к спонтанному развитию воспалительного заболевания кишечника [8]. Вместе с тем, было показано, что хронический стресс может вызывать и сдвиг от Th1 к Th2-ответу, а также провоцировать развитие не только воспаления, но и опухолей толстого кишечника [5]. Это подтверждается также данными относительно сдвига Th1/Th2 баланса в сторону Th2-клеток в условиях индуцированной социальным стрессом бронхиальной астмы и воспаления дыхательных путей [9].

Кроме того, развитие ХСС приводило к увеличению количества Rorγt⁺ лимфоцитов (на 94% — в 2,1 раза в ЗЛВ, в 2,3 раза в СЭЗ только в случае

ХСС2) по сравнению с контролем и сопровождалось ростом концентрации Ror γ t. Эти изменения происходили на фоне уменьшения количества CD25⁺ (на 41% — в 2,1 раза), Foxp3⁺-лимфоцитов (на 44—49% в ЗЛВ, 20—39% в СЭЗ) и свидетельствовали о доминировании в условиях ХСС Th17- и Th1-дифференцировки и повышении уровня провоспалительной сигнализации в кишечнике (рисунок). Полученные нами результаты совпадают с данными, демонстрирующими, что при развитии стресса и стресс-индуцированной депрессии в лимфоидных органах у мышей изменяется количество Th17-лимфоцитов, и нарушается баланс между T_{reg}/Th17-клетками [10]. Это подтверждается и обнаруженной нами общей тенденцией к существенному снижению соотношения T_{reg}/Th17-лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс. Так, коэффициент распределения Foxp3⁺/Ror γ t⁺-клеток уменьшился в ЗЛВ в 4,1 раза ($p < 0,05$) на фоне ХСС1 и в 3,5 раза ($p < 0,05$) при ХСС2; в СЭЗ — на 39% ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 3,8 раза ($p < 0,05$) в случае ХСС2, по сравнению с контролем.

Нами установлено, что развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией по увеличению общего количества LMP2⁺-лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс, наиболее выраженной в ЗЛВ, а изменение концентрации LMP2 в иммунных клетках зависело от вида стресса. Так, суммарная плотность LMP2⁺-клеток в ЗЛВ выросла в 3,2 раза ($p < 0,05$) в условиях ХСС1 и в 2,5 раза ($p < 0,05$) при ХСС2; в СЭЗ — в 2,6 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 и на 46% ($p < 0,05$) на фоне ХСС2 (рисунок). Повышенная экспрессия LMP2 может способствовать развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности, СД1 типа, ревматоидного артрита, неспецифического язвенного колита [11], болезни Крона [12], воспалительных заболеваний кишечника [13]. Кроме того, иммунные протеасомы влияют на дифференцировку, выживание и пролиферацию Т-лимфоцитов, а их ингибирование приводит к уменьшению экспансии Th1 и Th17-клеток и способствует развитию T_{reg} при экспериментальном колите, индуцированном DSS [14].

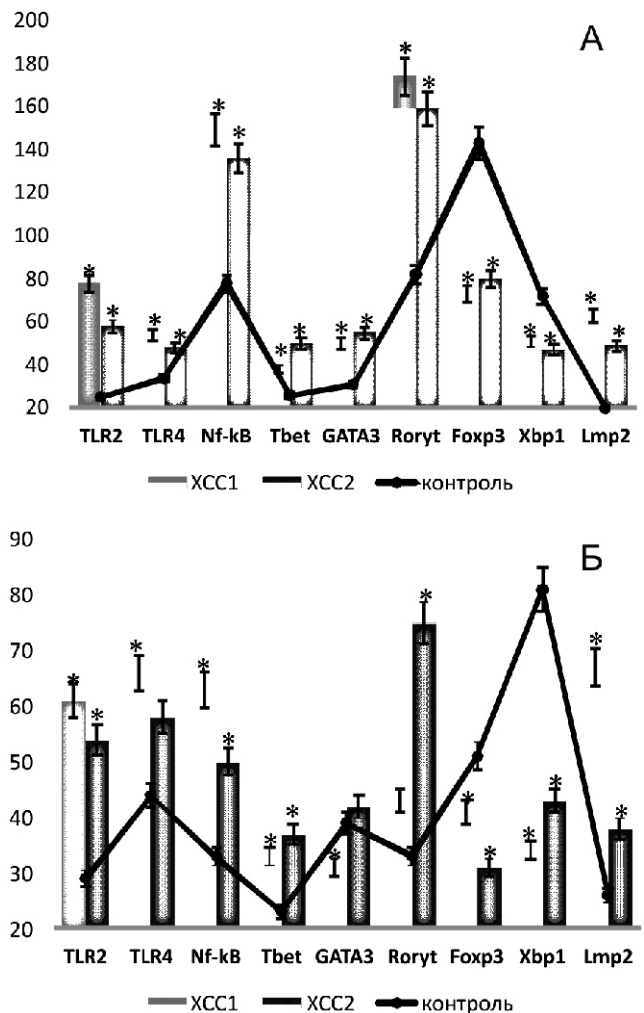
Развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией по снижению общего количества ХВР1⁺ лимфоцитов в ЗЛВ на 31% (ХСС1) — 35% (ХСС2) ($p < 0,05$), в СЭЗ — на 47% (ХСС2) — 58% (ХСС1) ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Известно, что изменение экспрессии ХВР1 может являться триггером развития воспалительных и АИЗ [15, 16], а ХВР1-дефицитные В-лимфоциты демонстрируют нарушенную дифференцировку в плазмощиты и изменения продукции антител [17].

Следовательно, согласно вышеизложенному, события, происходящие в КАЛТ в условиях ХСС, явно противоречат классической парадигме стресса и провоцируют не иммуносупрессию, а выраженную активацию иммунной системы и воспалительный процесс.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что развитие ХСС сопровождается увеличением количества TLR2⁺- и TLR4⁺-лимфоцитов в КАЛТ, изменяет баланс TLR2⁺/TLR4⁺-клеток, усиливает экспрессию Nf-kB, что свидетельствует об активации врожденной иммунной системы.

В условиях ХСС наблюдается дисбаланс субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ, приводящий к увеличению соотношения T-bet⁺/GATA3⁺ и снижению



Количество иммунопозитивных клеток в ЗЛВ (А) и СЭЗ сгруппированных лимфоидных узлов (Б) в условиях ХСС: * — $p < 0,05$ по отношению к контролю (А–Б).

Foxp3⁺/Rorγt⁺-клеток, свидетельствуя о доминировании в условиях ХСС Th1- и Th17-дифференцировки, повышении уровня про-воспалительной сигнализации в кишечнике на фоне супрессорной недостаточности.

Развивающийся на фоне ХСС иммунопротеасомный дефект и стресс эндоплазматической сети, влияя на уровень процессинга антигенов, активацию «наивных» Т-лимфоцитов и направление их дифференцировки могут быть одними из триггеров развития АИЗ и ВЗК.

References

1. Powell N. Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain, Behavior and Immunity*. 2013; 30: 41-7.
2. Littman D., Rudensky A. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010; 140: 845-58.
3. Martins M. Functional stability of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Trends Mol Med*. 2012; 18 (8): 454-62.
4. Reber S. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain Behav. Immun.* 2011; 25: 1153-61.
5. Hou N. Zhang X., Zhao L. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *BiochemBiophys Res Commun*. 2013; 439 (4): 471- 76.
6. Avgustinovich D., Kovalenko I. Gender-related characteristics of responding to prolonged psychoemotional stress in mice. *Neurosc. Behav. Physiol*. 2009; 40(3): 858-67.

7. Kaluyev A.V. *Stress and grooming*. Moscow: Aviks. 2002.

8. Schmidt D. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th17 cell responses. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(7): 1097 — 104.

9. Ohno I. Bronchial asthma and psychological stress. *RinshoByori*. 2010; 58(3): 292 — 99.

10. Hong M. Imbalance between Th17 and T-reg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice. *Neuroimmunomodulation*. 2013; 20(1): 39-50.

11. Basler M., Kirk C., Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol*. 2013; 1: 74 — 80.

12. Visekruna A., Slavova N., Dullat S. et al. Expression of catalytic proteasome subunits in the gut of patients with Crohn's disease. *Int J ColorectDis*. 2009; 10: 1133 — 39.

13. Fitzpatrick L., Khare V., Small J., Koltun W. Dextran-sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout-mice. *DigDisSci*. 2006; 51: 1269 — 76.

14. Kalim K., Basler M., Kirk C., Groettrup M. Immunoproteasome Subunit LMP7 Deficiency and Inhibition Suppresses Th1 and Th17 but Enhances Regulatory T Cell Differentiation. *The J. of Immunology*. 2012; 189: 4182 — 93.

15. Glimcher L. XBP1: the last two decades. *Ann. Rheum. Dis*. 2010; 69: 67 — 1.

16. Kaser A., Blumberg R. Survive an innate immune response through XBP1. *Cell Research*. 2010; 20: 506 — 7.

17. Todd D., Lee A., Glimcher L. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and auto immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2008; 9: 663 — 74.

Сведения об авторах:

Камышный Александр Михайлович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ