

ТИПОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА НА ОСТРЫЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ СТРЕСС

Е.Р. Эрастов, *д-р мед. наук, доцент*

В.А. Мордвинов, *студент*

**Приволжский исследовательский медицинский университет
(Россия, г. Нижний Новгород)**

DOI:10.24412/2500-1000-2026-4-1-177-182

Аннотация. На модели острого комбинированного стресса у 19 нелинейных мышей-самцов при помощи кластерного анализа найдены и визуализированы три основных дострессовых эндофенотипа, имеющих выраженные морфофункциональные эквиваленты в структуре селезенки и зубчатой извилины гиппокампа. Выявлена качественная перестройка корреляционных ландшафтов в зависимости от конкретного эндофенотипа.

Ключевые слова: острый комбинированный стресс; эндофенотип; поведенческие реакции; селезенка; гиппокамп; перекисное окисление липидов.

Известно, что острый психогенный стресс часто инициирует мультиорганный ответ, интегрирующий активность всех систем организма. Классический исследовательский подход, связанный с выявлением статистически значимых различий средних значений между интактной и экспериментальной группами, не учитывает целостность функциональных процессов и конституциональную вариабельность особей. Не секрет, что биология и медицина представляют собой как раз те области знания, где исследователи зачастую сталкиваются с гетерогенными выборками, что неизбежно ведет к снижению надежности статистических выводов.

Цель работы – заключалась в выявлении типологических особенностей системной реакции организма в ответ на острый комбинированный стресс (ОКС) короткой продолжительности.

Материал и методы исследования. Работа проведена на 19 содержащихся в стандартных условиях вивария половозрелых нелинейных мышах-самцах (возраст 10-12 недель). Животные интактной группы составили 10, а опытной – 9 особей. Модель ОКС представляла собой комплексное двухчасовое воздействие: иммобилизацию в индивидуальных пластиковых перфорированных контейнерах в сочетании с шумом интенсивностью 120 дБ (в течение первого часа) и постоянным освещением лампой накаливания 60 Вт (в течение второго часа). До и после эксперимента были проведены классические нейробиологи-

ческие методики «Открытое поле» и «Вынужденное плавание» [1, 2]. Головной мозг и селезенку после фиксации заливали в парафин-целлоидиновые блоки. На срезах селезенки в 20 случайных полях зрения при увеличении $\times 400$ оценивали: 1) число лимфоидных фолликулов на мм^2 площади изучаемого среза 2) среднюю площадь фолликула 3) соотношение зон красной пульпы (паренхиматозной и стромальной), рассчитываемое как отношение плотности элементов в паренхиме к плотности в ретикулярной строме 4) среднюю ширину синусов красной пульпы (10 перпендикулярных замеров в каждом поле зрения). Мозг резали во фронтальном направлении через зубчатую извилину гиппокампа, в гранулярном слое которого при увеличении $\times 1000$ на 10 микрофотографиях проводили оценку глиального индекса и среднего объема нейронов. В крови, полученной после декапитации мышей, по методу Волчегорского [3] при помощи спектрофотометра определяли продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) – основания Шиффа (ОШ), диеновые (ДК) и триеновые (ТК) конъюгаты, высчитывали коэффициент липопероксидации (ОШ/(ДК+ТК)). Математическую обработку определяли в среде R (v.4.3.1). Для сопоставления интактной и экспериментальной групп по отдельным количественным параметрам применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни, поскольку полученные данные в абсолютном большинстве случаев не соответствовали нормальному распределению

(критерий Шапиро-Уилка). Для оценки системных взаимодействий проведены четыре вида анализа. Во-первых, для достоверного выявления естественных группировок мышей по всему массиву полученных данных проводили иерархический кластерный анализ по стандартизированным (Z -score) значениям изучаемых ключевых параметров. Во-вторых, широко применяли корреляционный анализ. Так, для интактной и экспериментальной групп рассчитывали матрицы парных ранговых корреляций Спирмена (ρ), в которых, согласно принятым в биологических и медицинских исследованиях правилам, корреляции с $p < 0,05$ считались статистически значимыми. В-третьих, для визуализации взаимного расположения особей в пространстве, определяемом первыми двумя главными компонентами (PC1 и PC2), объясняющими максимальную долю общей дисперсии, использовали анализ главных компонент (PCA). В-четвертых, анализировали паттерны значимых корреляций между переменными значениями разных систем.

Результаты исследования и их обсуждение. Известно, что кластерный анализ представляет собой совокупность многомерных статистических процедур, направленных на обнаружение естественной группировки объектов в пространстве признаков. В отличие от дискриминантного анализа, где принадлежность к группам известна априорно, кластерный анализ решает задачу поиска латентной структуры данных без привлечения априорной информации о групповой принадлежности. Кластерный анализ по стандартизирован-

ным значениям десяти изученных ключевых признаков позволил выявить три устойчивых кластера, что говорит о существовании до-стрессовых эндотипов.

Тип первый, «стресс-ассоциированный» ($n = 9$), включал 7 из 8 животных, получивших ОКС короткой продолжительности и 2 интактных животных. Для него характерны максимальные значения ширины синусов селезенки, площади фолликулов и глиального индекса гиппокампа, а также преобладание в селезенке сосудистого компонента (рис. 1 и 2).

Морфологически определяется утолщенная за счет фиброза (до 12-18 мкм) капсула, расширенные (28-42 мкм) трабекулы с артериолами гипертрофированного типа. Белая пульпа занимает 32-38% (при норме 25-35%) площади среза, периартериальные лимфоидные вагины расширены (диаметр 115-150 мкм), фолликулы крупные (диаметр 190-270 мкм). Центры герминативного размножения четко очерчены (диаметр 85-120 мкм), состоят из бластных элементов диаметром 14-22 мкм с выраженными ядрышками. Периферические зоны светлые с контрастной маргинальной зоной, шириной 20-28 мкм. Красная пульпа занимает 62-68% площади среза. Синусы расширены (диаметр 38-60 мкм), просветы заполнены эритроцитами в стазе, эндотелий отечен с кубовидной морфологией. Паренхиматозные тяжи гиперцеллюлярны (плотность таких тяжей обычно 290 ± 30 тысяч клеток на мм^2), макрофаги крупнопольморфные (22-30 мкм) с выраженной вакуолизацией цитоплазмы.

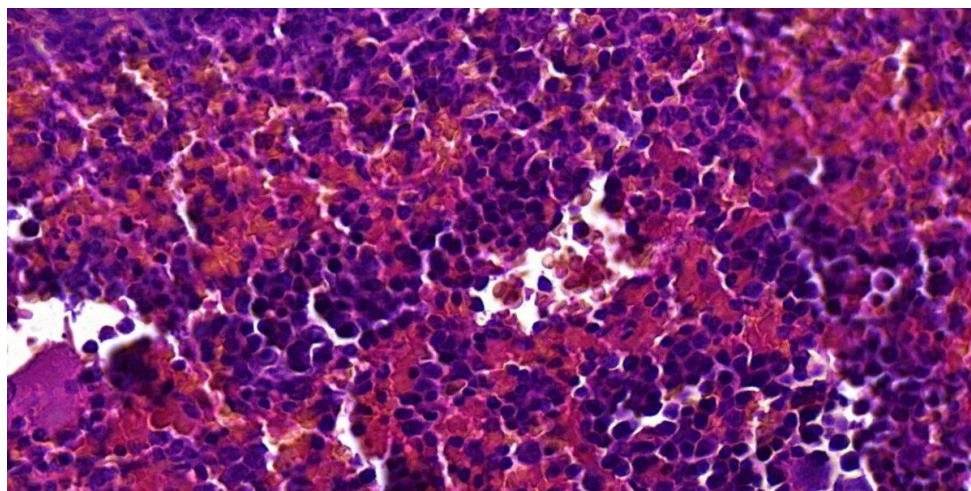


Рис. 1. Микрофото селезенки, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$.
Эндотип первый.

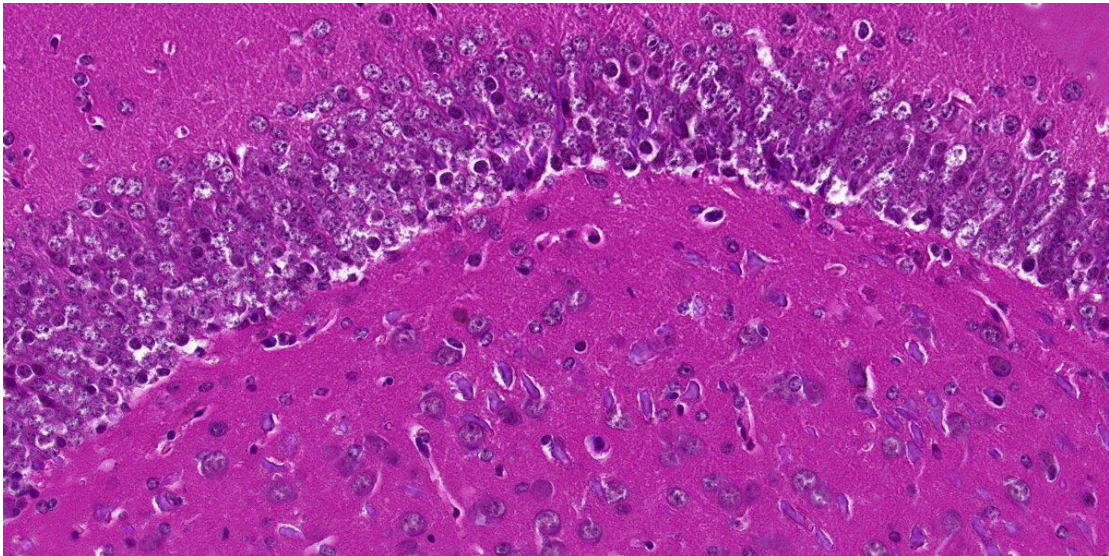


Рис. 2. Микрофото зубчатой извилины гиппокампа, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 1000$. Эндофенотип первый.

В зубчатой извилине гиппокампа гранулярный слой толщиной 20-25 мкм сохраняет компактность, плотность гранулярных нейронов составляет 192 ± 25 тысяч на мм^2 (укладывается в норму). Нейроны среднего размера (диаметр 14-18 мкм), ядра округлые (диаметр 9-12 мкм) с пикнотичным хроматином (гиперхромия у 20-28% клеток). Глиальный индекс составляет $1,8 \pm 0,3$. Глиальные ядра мелкие (5,5-8 мкм), гиперхромные, располагаются по 4-7 вокруг нейронов и капилляров. Молекулярный слой отечен (расстояние между

клетками увеличено), микроглия амебоидной формы.

Тип второй, «дизинтегрированный» ($n = 4$), состоял исключительно из интактных животных. Ключевая черта этого эндофенотипа – экстремально высокое время пассивного плавания животных при минимальных значениях глиального индекса и умеренных показателях ПОЛ. Это состояние мы понимаем как «чистую» поведенческую дезинтеграцию без признаков нейровоспаления и периферического окислительного стресса (рис. 3 и 4).

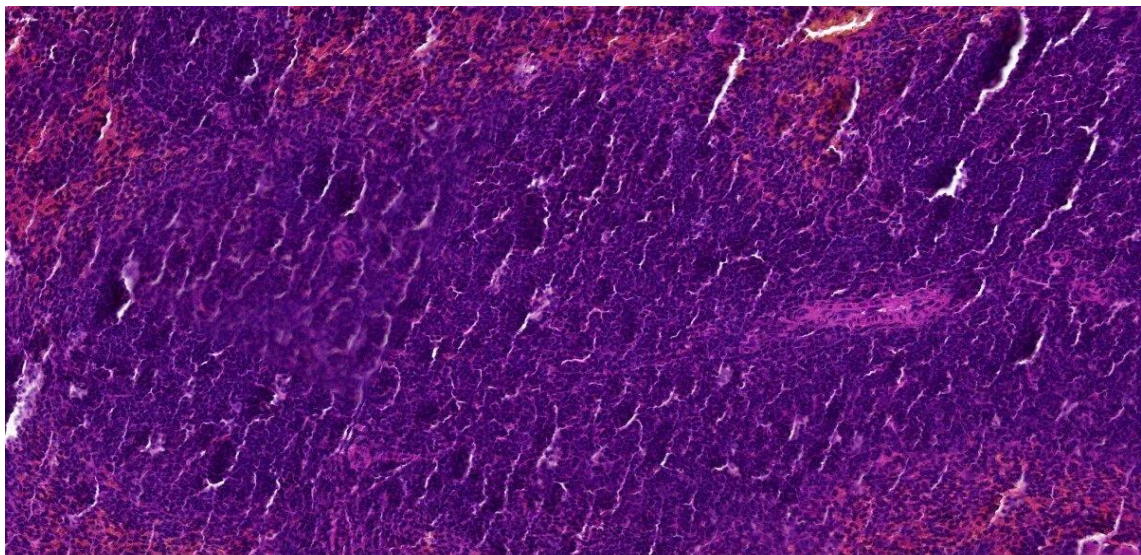


Рис. 3. Микрофото селезенки, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$. Эндофенотип второй.

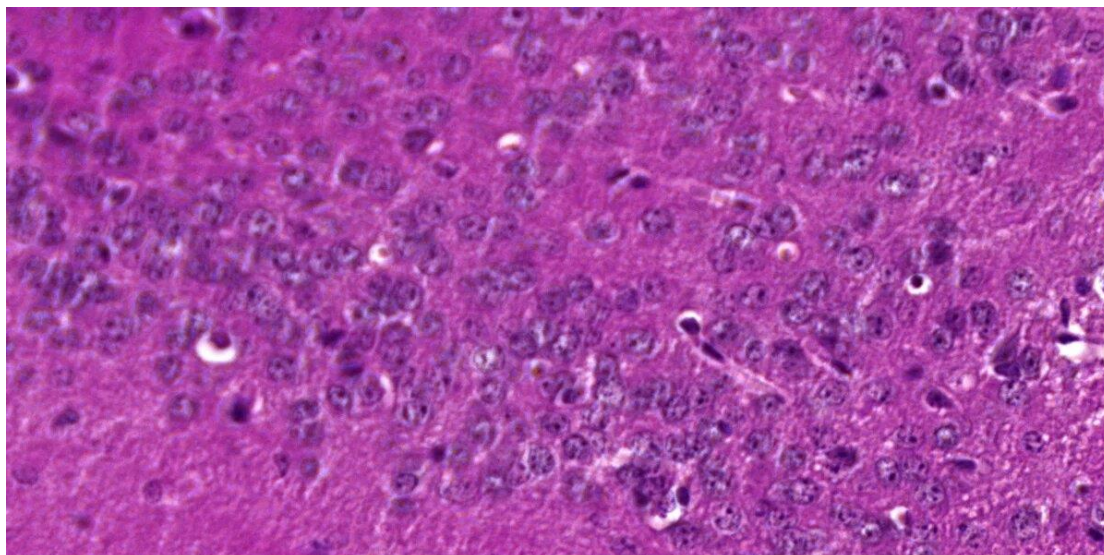


Рис. 4. Микрофото зубчатой извилины гиппокампа, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 1000$. Эндофенотип второй.

По сравнению с первым эндофенотипом наблюдается выраженное истончение капсулы селезенки (5-9 мкм), трабекулы фрагментированы (ширина 10-18 мкм). Белая пульпа представлена у этих животных гораздо в меньшей степени, чем у животных первого эндофенотипа (18-24% площади среза), периартериальные лимфоидные вагины сужены (диаметр 60-85 мкм), фолликулы мелкие (диаметр 90-140 мкм). Центры герминативного размножения гипоплазированы (диаметр 28-45 мкм). Доля красной пульпы, напротив, относительно велика (76-82% площади среза). Синусы резко сужены (диаметр 13-25 мкм), эритроциты слоисто уложены, эндотелий атрофирован. Паренхима гипоцеллюлярна (плотность 140 ± 20 тысяч клеток на мм^2), строма отечна, макрофаги мелкие (13-18 мкм) с гомогенной цитоплазмой.

В зубчатой извилине гиппокампа обнаружено разрежение гранулярного слоя (толщина 12-17 мкм), плотность гранулярных нейронов снижена до 120 ± 18 тысяч на мм^2 . Нейроны атрофированы (диаметр 9-14 мкм), ядра с

фрагментацией хроматина (кариорексис у 30-38% клеток). Глиальный индекс принимает минимальные показатели ($0,4 \pm 0,2$). Молекулярный слой с вакуолизацией олигодендроцитов, сателлитоз нейронов отсутствует. Подгранулярная зона атрофирована без пролиферативной активности.

Тип третий, «структурно-компенсированный» (n = 5), включал оставшихся интактных животных. Он характеризовался средними значениями по всем изучаемым параметрам, представляя, по-видимому, наиболее сбалансированный, или резистентный, эндофенотип (рис. 5 и 6).

Капсула селезенки средней толщины (8-12 мкм), трабекулы развиты умеренно (ширина 16-26 мкм). Белая пульпа занимает 26-32% площади среза, периартериальные лимфоидные влагалища оптимальной ширины (80-115 мкм), фолликулы округлые (диаметр 140-210 мкм). Центры герминативного размножения четко выражены (диаметр 58-95 мкм), лимфоциты среднего размера (10-15 мкм) с единичными бластными формами.

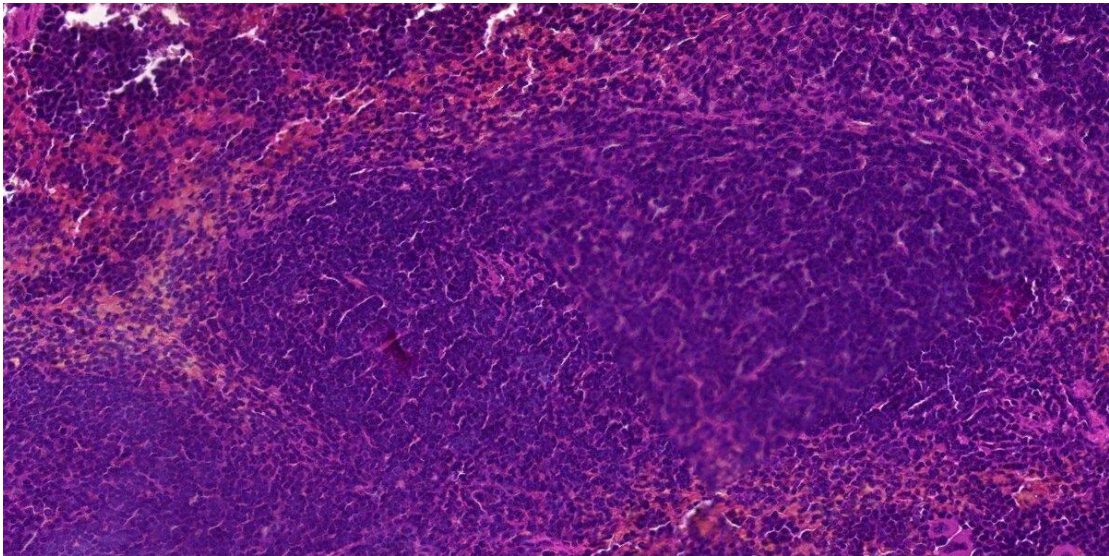


Рис. 5. Микрофото селезенки, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$.
Эндофенотип третий.

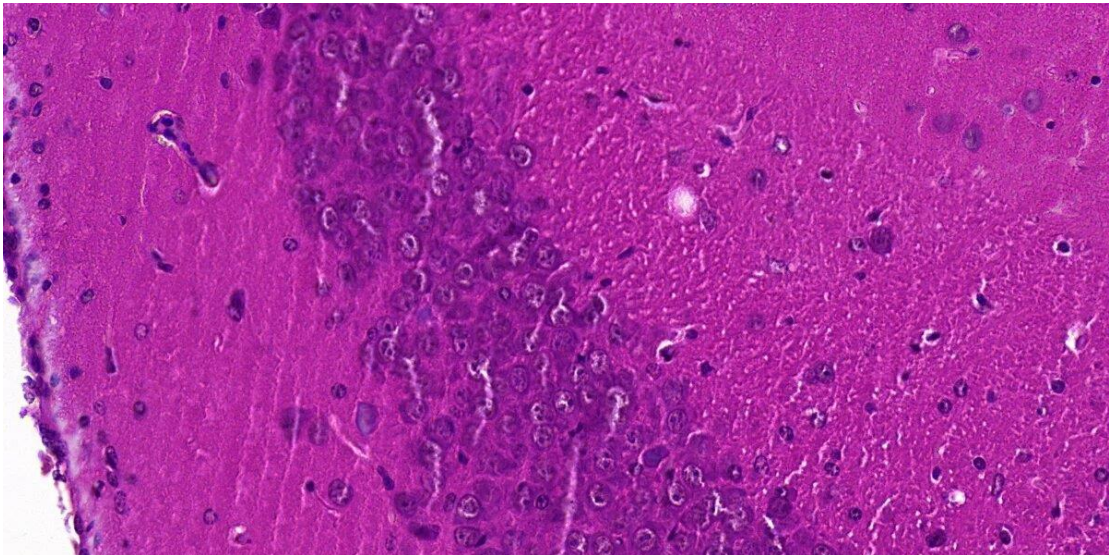


Рис. 6. Микрофото зубчатой извилины гиппокампа, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 1000$. Эндофенотип третий.

Маргинальная зона контрастно очерчена. Красная пульпа занимает 68-74% площади среза. Синусы физиологичны (диаметр 22-37 мкм), паренхима нормоцеллюлярна (плотность 220 ± 22 тысячи клеток на мм^2), макрофаги активны умеренно (16-24 мкм).

В зубчатой извилине гиппокампа гранулярный слой компактный (толщина 21-26 мкм), плотность гранулярных нейронов 218 ± 21 тысяча на мм^2 . Нейроны крупные (диаметр 15-20 мкм), ядра с четкими ядрышками. Глиальный индекс $0,9 \pm 0,2$. Глиocyты равномерно распределены (соотношение 1:9 к нейронам). Молекулярный слой без отека, подгранулярная зона развита с пролиферативными элементами.

Радикальные различия между группами показали сравнение корреляционных матриц и их тонкую визуализацию в виде сетей. В интактной группе выявлена плотная, когерентная сеть с несколькими сильными положительными связями. Связь между общей двигательной активностью и соотношением паренхимы и стромы селезенки оказалась наиболее значимой ($\rho = +0,883$, $p < 0,001$). Это указывает на существование в норме тесной положительной связи между уровнем спонтанной исследовательской активности и гистоархитектоникой ведущего органа периферической иммунной системы. Интересно, что в экспериментальной группе эта связь была инвертирована, ($\rho = -0,357$, $p > 0,05$). Парал-

тельно с ней обнаружено формирование сверхсильной отрицательной связи между шириной синусов селезенки и двигательной активностью и ($\rho = 0,905, p < 0,05$).

Наиболее значимым результатом ланной работы было обнаружение качественной перестройки корреляционных ландшафтов. Сильная положительная связь между двигательной активностью и соотношением паренхимы и стромы селезенки, обнаруженная в

интактной группе ($\rho = +0,883, p < 0,05$), по-видимому, генетически детерминирована. Полное разрушение и инверсия этой связи при ОКС ($\rho = -0,357, p > 0,05$) свидетельствует о дезинтеграции системы.

Таким образом, анализ индивидуальных траекторий и естественных кластеров (эндотипов) позволяет выявить особенность системного ответа организма на ОКС короткой продолжительности.

Библиографический список

1. Амикишиева А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А.В. Амикишиева // Информационный вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 529-542. – EDN MUVKFZ.
2. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants // Arch Int Pharmacodyn Ther. – 1977. – Vol. 229, № 2. – Pp. 327-336.
3. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 1. – С. 127-131. – EDN SKGMSF.
4. Морфофункциональное состояние селезенки под влиянием светового десинхроноза в эксперименте / О.В. Злобина, А.Н. Иванов, А.Ю. Каретникова [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 533-536. – EDN VWILPF.
5. Llorens-Martín M., Rábano A., Ávila J. The Ever-Changing Morphology of Hippocampal Granule Neurons in Physiology and Pathology. Front Neurosci. 2016 Jan 19; 9: 526. DOI: 10.3389/fnins.2015.00526. PMID: 26834550; PMCID: PMC4717329.

TYOLOGICAL FEATURES OF THE BODY'S SYSTEMIC RESPONSE TO ACUTE COMBINED STRESS

E.R. Erastov, *Doctor of Medical Sciences, Associate Professor*

V.A. Mordvinov, *Student*

**Volga Region Research Medical University
(Russia, Nizhny Novgorod)**

Abstract. Using a model of acute combined stress in 19 nonlinear male mice, three main stress endophenotypes with pronounced morphofunctional equivalents in the structure of the spleen and dentate gyrus of the hippocampus were found and visualized using cluster analysis. A qualitative restructuring of correlation landscapes has been revealed depending on a specific endophenotype.

Keywords: acute combined stress; endophenotype; behavioral reactions; spleen; hippocampus; lipid peroxidation.