

УДК 615:576.8.093.2:616-992.4

ВЛИЯНИЕ ИММУНИЗАЦИИ НА АДАПТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССИРОВАНИИ ЖИВОТНЫХ

¹Тюренков И.Н., ¹Филина И.С., ²Гумилевский Б.Ю., ¹Волотова Е.В., ¹Бакулин Д.А.

¹ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Волгоград;

²ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Волгоград, e-mail: i.s.filina@yandex.ru

На аутобредных белых крысах-самцах 12-месячного возраста изучено влияние иммунизации корпускулярным антигеном на состояние иммунной системы и уровни основных гормонов нейроэндокринной и цитокиновой регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси после воздействия хронического комбинированного стресса. Методы: хронический стресс моделировали путем комбинированного воздействия нескольких стрессирующих факторов в течение 6 дней (ежедневно по 30 мин) со сменой раздражителей. В периферической крови оценивали уровни КТРГ, АКТГ, кортикостерона, VCAM-1 и IL-6 и изучали общий анализ крови на 8-й день эксперимента. Результаты. У животных, подвергнутых хроническому стрессу, наблюдается истощение механизмов стресс-регуляции, о чем свидетельствует снижение уровня кортикостерона при незначительном увеличении КТРГ и АКТГ. При стрессировании на фоне иммунизации активность гуморальной регуляции оси гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников оставалась на высоком уровне за счет увеличения КТРГ, АКТГ с нормализацией кортикостерона до физиологического уровня. При хроническом стрессировании наблюдалось повышение содержания лейкоцитов в периферической крови, иммунизация корпускулярным антигеном на фоне стресса приводила к нормализации данного показателя, а также снижала исходный уровень IL-6. Заключение. Активация иммунного ответа повышает устойчивость к действию стрессорных факторов за счет высокого уровня регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, снижения уровня лимфоцитоза и изменения цитокинового профиля сыворотки животных в сторону снижения провоспалительной направленности иммунных реакций.

Ключевые слова: иммунизация, стресс, гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, цитокины

THE INFLUENCE OF IMMUNIZATION ON ADAPTATION BY CHRONIC STRESS OF ANIMALS

¹Tyurenkov I.N., ¹Filina I.S., ²Gumilevskiy B.Y., ¹Volotova E.V., ¹Bakulin D.A.

¹Volgograd state medical university, Volgograd;

²Volgograd state medical university, Volgograd, e-mail: i.s.filina@yandex.ru

This article is to evaluate the influence of immunization via corpuscular antigen on condition of immune system and levels of hypothalamic–pituitary–adrenal axis hormones, which are connected with neuroendocrine and cytokine regulation, under combined chronic stress. Methods: the study was conducted in 12 month male outbred rats. Chronic stress was modeled by the combined effects of several stressing factors for 6 days (30 min daily) with the changing of stimulus during 30 minutes. At the eighth day of the experiment levels of CRH, ACTH, corticosterone, VCAM-1 and IL-6 in peripheral blood were evaluated and general blood analysis was made. Results. Animals exposed to chronic stress demonstrated an exhaustion of stress regulation mechanisms, as evidenced by the reduction of corticosterone and slight increase in ACTH and CRH. During the stress under immunization the activity of humoral hypothalamic–pituitary–adrenal axis regulation remained at high levels, which was reflected by the increase of CRH and ACTH with the normalization of corticosterone at the same time. Furthermore, the stress group demonstrated the elevated levels of peripheral blood leukocytes. Immunization via corpuscular antigen during the stress led to the normalization of this value, as well as reduction of IL-6 levels. Conclusion. The immune response activation increases the stressing factor resistance due to the stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. As a result, the normalization of lymphocytosis and serum cytokine profile took place.

Keywords: immunization, stress, hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cytokines

Известно, что нервная и иммунная системы достаточно тесно связаны друг с другом как через гуморальные факторы, так и через непосредственные клеточные контакты [3, 7]. Активация иммунного воспаления вызывает определенные нейроэндокринные изменения в организме [4, 8]. Многие из таких изменений аналогичны тем, которые вызываются физическими или психологическими стресс-факторами [6, 5]. Это позволяет предположить, что иммунный ответ может быть как компонентом стресс-реакции, так и стресс-фактором, способным влиять как традиционные стрес-

соры на высвобождение кортикотропин-рилизинг гормонов гипоталамуса и на состояние других стресс-реализующих систем. Такие эффекты могут быть вызваны за счет влияния провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α на состояние нейроэндокринной системы, через регуляцию синтеза и рецепции нейромедиаторов [6]. Кроме того, есть данные о том, что стрессовые факторы и цитокины могут воздействовать синергично на биологические и поведенческие процессы, и это может иметь долгосрочные последствия через хронизацию процессов, связанных с реакцией

на стресс [5]. В связи с вышеизложенным представляет определенный научный интерес исследование влияния иммунизации на состояние некоторых систем, участвующих в реализации стресс-реакции организма.

Цель исследования. Оценка состояния нейроэндокринного и цитокинового статуса организма крыс после хронического стрессирования на фоне иммунизации корпускулярным антигеном.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в соответствии с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», с ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и было одобрено Региональным Независимым Этическим Комитетом (ГУ «Волгоградский медицинский научный центр»): протокол № 132-2012.

Эксперименты проводили на аутбредных белых крысах-самцах в возрасте 12 месяцев массой 340–380 г. (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Раполово» РАМН), разделенных на группы по 10 особей в каждой, содержавшихся в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым свето-темновым циклом, при температуре воздуха 20 ± 2 °С, влажности 60%, свободном доступе к воде и полнорационному гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92).

Лабораторные животные были разделены на группы следующим образом: группа 1 (Интактная) – не подвергались стрессированию и иммунизации антигеном – эритроцитами барана (ЭБ); группа 2 (Стресс) – подвергались стрессированию и не подвергались иммунизации антигеном ЭБ; группа 3 (Стресс на фоне иммунизации) – подвергались стрессированию и иммунизации.

Иммунизацию животных осуществляли тимус-зависимым корпускулярным антигеном – эритроцитами барана однократно внутривенно в дозе $5 \cdot 10^8$ клеток в 500 мкл физиологического раствора на 3-й день от начала стрессирования животных.

Стрессирование животных проводили путем комбинированного воздействия нескольких стресси-

рующих факторов в течение 6 дней (ежедневно по 30 мин) со сменой во время «сеанса» стрессорных раздражителей каждые 5 мин [1, 2].

Периферическую кровь изучали с помощью гематологического анализатора Abacus junior B12 (Австрия). Для дифференциации гранулоцитов на палочкоядерные и сегментоядерные исследовали лейкоцитарную формулу крови в гематологическом мазке.

Определение нейроэндокринового и цитокинового статуса проводили с использованием наборов фирмы «Cusabio-Rab» методом твердофазного ИФА на следующие показатели: кортикотропин-рилизинг-гормон (КТРГ), аденокортикотропный гормон (АКТГ), кортикостерон, молекула клеточной адгезии VCAM-1, IL-6.

Результаты исследования статистически обрабатывались с использованием рангового однофакторного анализа Крускала – Уоллиса, критерия Ньюмена – Кейлса, критерия Данна.

Результаты исследования и их обсуждение

В периферической крови животных, подвергнутых хроническому стрессу, на 8 день эксперимента наблюдался выраженный лейкоцитоз ($11,99 \pm 1,1 \cdot 10^9$ кл/л против $7,72 \pm 0,81 \cdot 10^9$ кл/л у интактных животных, $p < 0,05$) за счет увеличения содержания лимфоцитов ($9,09 \pm 0,91 \cdot 10^9$ кл/л против $5,72 \pm 0,72 \cdot 10^9$ кл/л у интактных животных, $p < 0,05$) и моноцитов ($0,3 \pm 0,08 \cdot 10^9$ кл/л против $0,06 \pm 0,03 \cdot 10^9$ кл/л у интактных животных, $p < 0,05$) (табл. 1). Уровни гранулоцитарных лейкоцитов, как сегментоядерных, так и палочкоядерных в периферической крови у стрессированных животных не отличались от контрольной группы. Наибольшая реакция отмечена со стороны лимфоидного ростка. Полученные результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о наибольшей чувствительности к стрессовым воздействиям лимфоцитов среди всех субпопуляций лейкоцитов [3].

Таблица 1

Содержание разных форм лейкоцитов в периферической крови крыс ($M \pm m$)

10 ⁹ кл/л \ Группа	Интактные	Стрессированные	Стрессированные на фоне иммунизации
Лейкоциты	$7,72 \pm 0,81$	$11,99 \pm 1,14$ *	$7,95 \pm 0,72$ #
Лимфоциты	$5,72 \pm 0,72$	$9,09 \pm 0,91$ *	$5,20 \pm 0,50$ #
Моноциты	$0,06 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,08$ *	$0,05 \pm 0,02$ #
Гранулоциты сегментоядерные	$1,72 \pm 0,22$	$2,22 \pm 0,39$	$2,37 \pm 0,50$
Гранулоциты палочкоядерные	$0,05 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,02$
Гранулоциты эозинофильные	$0,17 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,08$

Примечания: * – значимые различия ($p < 0,05$) от интактных животных; # – значимые различия ($p < 0,05$) между группами стрессированных животных.

У стрессированных животных, подвергшихся иммунизации корпускулярным антигеном, не наблюдалось увеличения

числа лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови в выбранные сроки наблюдения, как это было отмечено

у неиммунизированных стрессированных животных. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о протективном влиянии иммунизации на стресс реакцию со стороны белого ростка периферической крови.

Для оценки состояния стресс реализующей системы гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников у экспериментальных животных было исследовано содержание соответствующих гормонов. В ходе исследования выяснилось, что у крыс на 8 день экспери-

мента после 6 дней хронического стрессирования значимо снижен уровень кортикостерона по сравнению с интактными животными ($2,8 \pm 0,7$ нг/мл против $5,6 \pm 0,9$ нг/мл у интактных животных, $p < 0,05$), при этом содержание в сыворотке КТРГ и АКТГ значимо не различалось (табл. 2). Это может свидетельствовать о нарушении регуляции в системе стресс реализующих систем и о возможном истощении функции коры надпочечников, так как уровень КТРГ и АКТГ незначительно увеличился.

Таблица 2

Уровни гормонов в сыворотке крови крыс ($M \pm m$)

Показатель \ Группа	Интактные	Стрессированные	Стрессированные на фоне иммунизации
КТРГ, нг/мл	$0,33 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,05^*$
АКТГ, пг/мл	$2,1 \pm 0,16$	$2,3 \pm 0,16$	$2,9 \pm 0,18 \#$
Кортикостерон, нг/мл	$5,6 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,7^*$	$4,94 \pm 0,8 \#$

Примечания: * – значимые различия ($p < 0,05$) от интактных животных; # – значимые различия ($p < 0,05$) между группами стрессированных животных.

Стрессирование на фоне иммунизации привело к более выраженным сдвигам в содержании исследованных гормонов в сыворотке крови животных. Так, были повышены уровни КТРГ ($0,56 \pm 0,05$ нг/мл против $0,33 \pm 0,06$ нг/мл у интактных животных, $p < 0,05$) и АКТГ ($2,9 \pm 0,18$ нг/мл против $2,1 \pm 0,16$ нг/мл у интактных животных, $p < 0,05$) на фоне неизменного уровня кортикостерона относительно интактных животных. При сравнении уровней гормонов в группах стрессированных животных, выяснилось, что стрессирование на фоне иммунизации корпускулярным антигеном – эритроцитами барана – приводит к значимо более высокому содержанию в сыворотке крови крыс как КТРГ, АКТГ, так и кортикостерона ($0,56 \pm 0,05$ нг/мл против $0,42 \pm 0,04$ нг/мл; $2,9 \pm 0,19$ нг/мл против

$2,3 \pm 0,16$ нг/мл, $p < 0,05$; $4,94 \pm 0,8$ нг/мл против $2,8 \pm 0,7$ нг/мл, $p < 0,05$ при иммунизации животных соответственно).

Эти данные показывают, что у животных, подвергнутых хроническому стрессу, наблюдается истощение механизмов стресс регуляции. При стрессировании на фоне иммунизации активность гуморальной регуляции оси гипоталамус – гипофиз – кора надпочечников остается на значимо более высоком уровне и признаков истощения не наблюдается.

Исследование цитокинового профиля сыворотки животных после хронического стрессирования позволило установить, что содержание молекул VCAM-1 было значимо выше ($p < 0,05$) в обеих группах животных, подвергнутых стрессу по отношению к интактным крысам (табл. 3).

Таблица 3

Уровни цитокинов и адгезивных молекул в сыворотке крови крыс ($M \pm m$)

Показатель \ Группа	Интактные	Стрессированные	Стрессированные на фоне иммунизации
VCAM-1, нг/мл	$1,26 \pm 0,21$	$2,18 \pm 0,15^*$	$2,32 \pm 0,31^*$
IL-6, пг/мл	$3,01 \pm 0,23$	$2,87 \pm 0,16$	$2,16 \pm 0,12^* \#$

Примечания: * – значимые различия ($p < 0,05$) от интактных животных; # – значимые различия ($p < 0,05$) между группами стрессированных животных.

Уровень IL-6 в сыворотке был значимо ниже у иммунизированных животных, чем у интактных и стрессированных животных ($2,16 \pm 0,12$ пг/мл при стрессировании на фоне иммунизации против

$3,01 \pm 0,23$ пг/мл у интактных животных и $2,87 \pm 0,16$ пг/мл при стрессировании, $p < 0,05$).

Полученные результаты позволяют заключить, что стрессирование вне зависимости от иммунизации приводит к повышению уровня циркулирующих адгезивных молекул суперсемейства иммуноглобулинов VCAM-1, которые, как известно, [3] вовлечены в регуляцию адгезии лейкоцитов к эндотелию и их миграции за пределы сосудистого русла в очаг воспаления. Следует отметить, что увеличение уровня этих молекул происходит на фоне значимого снижения уровня IL-6 у иммунизированных животных, что свидетельствует о снижении провоспалительного потенциала животных.

Заключение

В целом полученные данные позволяют заключить, что активация иммунного ответа повышает устойчивость к действию стрессорных факторов за счет снижения уровня лимфоцитоза, изменения цитокинового профиля сыворотки животных в сторону снижения провоспалительной направленности иммунных реакций.

Список литературы

1. Волотова Е.В., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Филина И.С., Тюренков И.Н. Влияние фенибута на память и поведение крыс различных возрастных групп, подвергшихся 7-дневному комбинированному стрессорному воздействию // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1. – С. 23–26.
2. Тюренков И.Н., Багметова В.В., Чернышева Ю.В., Бородин Д.Д. Депрессивное состояние у крыс при хроническом комбинированном стрессе, вызванном сочетанием разномодальных стрессоров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 9, – С. 1045–1056.
3. Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В. Иммунофизиология. – Екатеринбург УрО РАН, 2002. – 223 с.
4. Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation implications for major depressive disorder // *J. Psychiatry Neurosci.* – 2009. – Vol. 34, № 1. – P. 4–20.
5. Brebner K., Hayley S., Merali Z., et al. Synergistic effects of interleukin-1, interleukin-6, and TNF- α neuroendocrine, neurochemical and behavioral changes // *Neuropsychopharmacology.* – 2000. – № 22. – P. 566–580.
6. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., et al. From inflammation to sickness and depression when the immune sys-

tem subjugates the brain // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2008. – № 9. – P. 46–56.

7. Irwin M.R. Human psychoneuroimmunology 20 years of discovery // *Brain. Behav. Immunol.* – 2008. – Vol. 22, № 2. – P. 129–139.

8. Maier S.F., Watkins L.R. Cytokines for psychologists implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition // *Psychol. Rev.* – 1998. – Vol. 105, № 1. – P. 83–107.

References

1. Volotova E.V., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Filina I.S., Tiurenkov I.N. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 2014, no. 1. pp. 23–26.
2. Tiurenkov I.N., Bagmetova V.V., Chernysheva Iu.V., Borodin D.D. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2013, vol. 99, no. 9, pp. 1045–1056.
3. Chereshev V.A., Yushkov B.G., Klimin V.G., Lebedeva E.V. *Immunofiziologija* [Immunophysiology]. Ekaterinburg, UrO RAN, 2002. 223 p.
4. Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation implications for major depressive disorder // *J. Psychiatry Neurosci.*, 2009, vol. 34, no 1. pp. 4–20.
5. Brebner K., Hayley S., Merali Z., et al. Synergistic effects of interleukin-1, interleukin-6, and TNF- α neuroendocrine, neurochemical and behavioral changes *Neuropsychopharmacology*, 2000, no 22, pp. 566–580.
6. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., et al. From inflammation to sickness and depression when the immune system subjugates the brain *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, no 9, pp. 46–56.
7. Irwin M.R. Human psychoneuroimmunology 20 years of discovery. *Brain. Behav. Immunol.*, 2008, vol. 22, no 2, pp. 129–139.
8. Maier S.F., Watkins L.R. Cytokines for psychologists implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition *Psychol. Rev.*, 1998, vol. 105, no 1, pp. 83–107.

Рецензенты:

Бородкина Л.Е., д.м.н., профессор кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Волгоград;

Бугаева Л.И., д.б.н., профессор, заместитель директора НИИ фармакологии, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 13.05.2014