УДК 612.017.1

МЕХАНИЗМЫ НЕЙРО-ИММУННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СТРЕССЕ И ПОДХОДЫ К ИХ КОРРЕКЦИИ

Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Дмитриенко Е.В., Каплина Э.Н.

Учреждение РАМН «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, e-mail: vrybakin@mail.ru

Исследование цитотоксической и пролиферативной активности спленоцитов, концентрации глюкокортикоидных гормонов и тестостерона в крови крыс, подвергнутых действию холодового стресса в различных режимах, позволило установить, что изменения функциональной активности иммунокомпетентных клеток зависят от интенсивности стрессорного воздействия, в то время как изменение уровня гормонов в крови не зависит от него: на обеих моделях стресса показано повышение уровня кортикостерона и снижение уровня тестостерона в крови животных. Впервые продемонстрированы иммуномодулирующие эффекты препарата нативной ДНК Деринат при стрессе, включающие его нормализующее действие на стресс-индуцированные изменения активности клеток иммунной системы.

Ключевые слова: стресс, иммунокомпетентные клетки, гормоны, Деринат

MECHANISMS OF NEURAL-IMMUNE INTERACTIONS UNDER STRESS AND THE APPROACHES TO THEIR CORRECTION

Rybakina E.G., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Dmitrienko E.V., Kaplina E.N.

Research Institute for Experimental Medicine NWD RAMS, St. Petersburg, e-mail: vrybakin@mail.ru

Studies of cytotoxic and proliferative activities of splenocytes as well as concentration of glucocorticoid hormones and testosterone in blood of rats, exposed to cold stress at different regimes, have shown that the changes in functional activity of immune-competent cells depend on the intensity of stress application, whereas alterations in blood hormone level do not depend on these conditions: employment of the both stress models revealed increased corticosterone concentration and reduced testosterone level in rat blood. Novel immunomodulatory effects of native DNA preparation Derinat under stress conditions were shown, including its normalizing action upon changed stress-induced activities of the immune system cells.

Keywords: stress, immune-competent cells, hormones, Derinat

В последнее десятилетие появляется все больше данных, подтверждающих возможность как позитивного, так и негативного эффектов стресса на защитные функции организма. Одним из основных механизмов развития дисфункций иммунной системы при тяжелом стрессе и ряде отягощенных стрессом заболеваний является нарушение взаимодействия нейроэндокринной и иммунной систем [3, 5, 9]. Выявление природы этих нарушений открывает новые возможности для адресного воздействия с целью их коррекции и, таким образом, лечения стресс-обусловленных заболеваний.

Потенциал защитных функций организма в значительной степени определяется уровнем активности клеток иммунной системы, включающим интенсивность пролиферации лимфоцитов при действии цитокина интерлейкина-1β (ИЛ-1β) и уровень цитотоксической активности естественных киллерных (ЕК) клеток, являющихся первым барьером на пути развития инфекционных и онкологических заболеваний [4, 8].

Анализ функциональных резервов иммунокомпетентных клеток в совокупности с другими показателями активности защитных функций, таких как активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной (ГГАКС) и гипоталамо-гипофизарно-гонодальной (ГГГС) систем организма, позволяет раскрыть механизмы их нарушений при различных дестабилизирующих воздействиях, в том числе при стрессе. Изменение концентраций в крови кортикостерона и тестостерона – гормонов, отражающих активность ГГАКС и ГГГС, соответственно – рационально также использовать в качестве показателей стрессорной реакции.

Одним из потенциальных корректоров нарушенных защитных функций является лекарственный препарат Деринат (АО ФП «Техномедсервис», Москва) – натриевая соль нативной ДНК с молекулярной массой 270–500 kDa, получаемая из молок лососевых или осетровых рыб, обладающая радиопротекторной, противовирусной, регенеративной активностью [1, 2].

Целью работы явилось исследование изменения цитотоксической и пролиферативной активности спленоцитов, концентрации глюкокортикоидных гормонов и тестостерона в крови крыс, подвергнутых действию холодового стресса в различных режимах, а также определение способа их коррекции с помощью препарата Деринат.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 89 крысах-самцах Wistar массой 200–220 г. Деринат, растворенный в 0,15 М NaCl, вводили животным однократно, в/бр в дозе10 мг/кг массы.

В работе использованы две модели экспериментального стресса: холодовой стресс (охлаждение крыс в индивидуальных металлических контейнерах в течение 10 мин при –20 °С) и комбинированный стресс (охлаждение животных, фиксированных на спине, в течение 30 мин при –20 °С).

Экспериментальные группы животных:

1. Интактные животные, находящиеся в условиях стандартного содержания.
2. Контрольные животные, которым в/бр вводили раствор 0,15 М NaCl.
3. Животные, которым в/бр вводили Деринат в дозе 10 мг/кг массы.
4. Животные, подвергнутые стрессорному воздействию через 20 мин после однократной в/бр иньекции раствора 0,15 М NaCl.
5. Животные, подвергнутые стрессорному воздействию через 20 мин после однократной в/бр инъекции Дерината в дозе 10 мг/кг массы.

При оценке цитотоксической активности ЕК клеток селезенки в качестве мишеней для них использовали клетки эритромиелолейкоза человека К-562 (Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург), которые метили ^{3}Н-уридином («Изотоп», Россия). Реакцию между клетками-эффекторами и клетками-мишенями учитывали по уровню ^{3}Н-уридина в нелизированных клетках-мишенях в течение 1 мин (с.р.m.) при использовании β-счетчика (Beckman).

Определение интенсивности реакции бласттрансформации спленоцитов (РБТС) осуществляли общепринятым методом [8] при внесении в суспензию клеток Кон А (Sigma, 0,75 мкг/мл) и рекомбинантного ИЛ-1β (Sigma) со специфической активностью $1{,}0 \cdot 10^7$ ед/мг белка в дозе 250 нг/мл. Оценку включения H^3-тимидин в ДНК делящихся клеток проводили на β-счетчике.

Концентрацию кортикостерона и тестостерона в крови определяли иммуноферментным методом с использованием реактивов Хема-Медика (РФ).

Статистическая обработка результатов проведена по критерию t Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Через 1 ч после окончания 10-минутного холодового стресса в крови крыс наблюдалось увеличение концентрации кортикостерона и снижение уровня тестостерона по сравнению с этим показателем у нестрессированных животных. Более интенсивное комбинированное 30-минутное воздействие также приводило к повышению уровня кортикостерона в крови через 1 ч с последующим возвращением к нормальным значениям через 24 ч и снижению концентрации тестостерона в оба регистрируемых срока (табл. 1). Полученные данные демонстрируют развертывание стрессорной реакции у животных при обоих видах воздействия.

Таблица 1

Изменение концентраций кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови крыс после введения Дерината в дозе 10 мг/кг массы и аппликации стресса различной интенсивности

Группы животных	КОРТИКОСТЕРОН нг/мл			ТЕСТОСТЕРОН нмоль/л		
	Сроки после введения Дерината и аппликации стресса					
		1 час	24 часа		1 час	24 часа
Интактные	31 ± 5			32 ± 4		
Контрольные (введение 0,15 М NaCl)		42 ± 4	39 ± 6		14 ± 4 ^	20 ± 6
Деринат (10 мг/кг массы)		91 ± 10*	75 ± 8*		39 ± 8*	38 ± 10
Контроль + стресс 10 мин		140 ± 7^	120 ± 8		10 ± 3^	30 ± 6
Деринат + стресс 10 мин		190 ± 12*	116 ± 15		29 ± 4*	68 ± 10*
Контроль + стресс 30 мин		380 ± 12^	44 ± 6		19 ± 3^	9 ± 3
Деринат + стресс 30 мин		360 ± 17	26 ± 3		53 ± 10*	43 ± 8*

Примечания:
* – $p < 0{,}05$ по сравнению с показателями в контрольной группе животных;
^ – $p < 0{,}05$ по сравнению с этим же показателем у интактных животных.

Введение Дерината нестрессированным крысам в дозе 10 мг/кг массы вызывало повышение концентрации кортикостерона и тестостерона через 1 ч, а кортикостерона также и через 24 ч после введения препарата по сравнению с этими показателями у контрольных животных (см. табл. 1).

У животных, которым до аппликации обоих видов стресса вводили Деринат, не наблюдалось изменения концентрации кортикостерона в крови по сравнению с тем же показателем у стрессированных животных, которым вводили 0,15 М NaCl (за исключением повышения уровня гормона через 1 ч после окончания 10-минутного холодового воздействия). В отличие от кортикостерона, концентрация тестостерона в крови крыс увеличивалась, если до аппликации стресса животным вводили Деринат (см. табл. 1). Таким образом, введение Дерината предот-

вращало стресс-индуцированное снижение концентрации тестостерона в крови, оказывая стресс-протективное действие.

Спленоциты интактных и контрольных животных оказывали цитотоксическое действие на клетки опухолевой линии К-562, которое было наиболее выражено при соотношении клетки-эффекторы:клетки-мишени = 25:1 (табл. 2). Введение Дерината в дозе 10 мг/кг массы крысы через 24 ч вызывало увеличение цитотоксической активности ЕК клеток по сравнению с тем же показателем у контрольных животных (см. табл. 2).

Таблица 2

Функциональная активность спленоцитов крыс через 24 ч после введения Дерината и аппликации стресса различной интенсивности

Группы животных	Цитотоксическая активность NK клеток, %	Активность РБТС, с.р.m. при стимуляции Con A и IL-1β		
		Нестимулированные лимфоциты	При стимуляции Con A	При стимуляции Con A и IL-1β
Интактные	20,6 ± 2,4	941 ± 65	2441 ± 235	7890 ± 680
Контрольные (введение 0,15 М NaCl)	21,6 ± 2,1	1012 ± 105	2710 ± 440	8210 ± 950
Деринат 10 мг/кг	29,7 ± 2,6*	1950 ± 220*	3250 ± 480	11920 ± 780*
Контрольные + стресс 10 мин	33,0 ± 3,6*	2537 ± 515*	6121 ± 880*	12910 ± 1050*
Деринат + стресс 10 мин	27,5 ± 3,4	3811 ± 680*	6504 ± 1180*	15650 ± 1680*
Контрольные + стресс 30 мин	15,0 ± 2,1*	1123 ± 99	2331 ± 540	5940 ± 818*
Деринат + стресс 30 мин	24,8 ± 3,0 #	1722 ± 241*	2895 ± 368	8150 ± 1106 #

Примечания:

* – $p < 0,05$ по сравнению с показателями в контрольной группе животных;

– $p < 0,05$ по сравнению с показателями в группе животных после 30-минутного стресса (Контрольные + стресс 30 мин).

Использованные в работе модели экспериментального стресса по-разному изменяли цитотоксичность спленоцитов крыс. Относительно мягкое, 10-минутное охлаждение животных без дополнительной их иммобилизации приводило к стимуляции цитотоксической активности спленоцитов через 24 ч после окончания воздействия, а введение Дерината до аппликации стресса препятствовало этому увеличению (см. табл. 2).

Интенсивное 30-минутное комбинированное воздействие приводило к угнетению цитотоксической активности спленоцитов через 24 ч после окончания действия стресса. Введение Дерината за 20 мин до этого воздействия предотвращало снижение специфической цитотоксичности ЕК клеток, восстанавливая ее до 95–123 % от уровня активности клеток интактных животных (см. табл. 2). Таким образом, введение Дерината в дозе 10 мг/мл оказывало выраженное протективное действие на функциональную активность ЕК клеток селезенки, измененную в результате холодовых стрессорных воздействий в различных режимах.

Введение Дерината интактным и контрольным животным вызывало увеличение скорости включения ^{3}Н-тимидина в ДНК делящихся спленоцитов в результате комитогенного действия ИЛ-1β в присутствии Кон А (см. табл. 2). Установлено, что 10-минутное охлаждение вызывает интенсификацию РБТС при инкубации клеток с Кон А, а также Кон А совместно с ИЛ-1β через 24 ч после окончания стрессорного воздействия по сравнению с уровнем этой реакции у интактных животных (см. табл. 2). Введение Дерината за 20 мин до аппликации 10-минутного стресса не приводило к изменению интенсивности РБТС (см. табл. 2). Комбинированное 30-минутное воздействие на крыс через 24 ч после его окончания вызывало снижение уровня РБТС. Инъекция Дерината до аппликации 30-минутного стресса через 24 ч восстанавливала интенсивность включения метки в нестимулированные лимфобласты, а также при их стимуляции Кон А и ИЛ-1β (см. табл. 2). Таким образом, введение Дерината приводило к усилению реакции спленоцитов крыс, подвергнутых 30-минутному комбинированному воздействию, на комитогенное действие ИЛ-1β и, следовательно, препятствовало стресс-индуцированному угнетению пролиферативной активности клеток.

Результаты исследований позволяют заключить, что стресс-обусловленные изменения функциональной активности иммунокомпетентных клеток зависят от интенсивности стрессорного воздействия: 10-минутное охлаждение крыс приводит к стимуляции специфической цитотоксичности и пролиферативной активности спленоцитов в ответ на комитогенное действие ИЛ-1β через 24 ч после окончания стрессорного воздействия, а интенсивное 30-минутное холодовое воздействие в сочетании с иммобилизацией животных вызывает снижение этих показателей. Изменение уровня гормонов в крови, наоборот, не зависит от вида воздействия: на обеих моделях стресса показано повышение уровня кортикостерона и снижение концентрации тестостерона в крови животных. Полученные результаты соответствуют данным литературы о контрфазном характере изменения содержания этих гормонов в крови при стрессе: повышение концентрации кортикостерона сопровождается снижением уровня тестостерона, которые реализуются на уровне гипофиза и имеют адаптивное значение [10].

При аппликации стресса на фоне введения препарата нативной ДНК Деринат установлено его стресс-протективное действие, проявляющееся в предотвращении снижения концентрации тестостерона в крови.

После введения Дерината в дозе 10 мг/кг цитотоксическая активность ЕК клеток селезенки, повышенная в условиях кратковременного стрессорного воздействия, снижается практически до нормы, а в случае ее угнетения, вызванного жестким комбинированным стрессом, она восстанавливается также до нормальных значений. Введение Дерината препятствует стресс-индуцированному угнетению пролиферативной активности спленоцитов, вызывая нормализацию реакции клеток на комитогенное действие ИЛ-1β. Таким образом, Деринат, расщепляющийся в клетках организма до нуклеотидов, которые после выделения во внеклеточную среду связываются с пуринергическими Р2 рецепторами [6, 7], обладает не только стресс-протективными эффектами, но и оказывает нормализующее действие на стресс-индуцированные изменения некоторых функций иммунной системы.

Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами клинических наблюдений [1, 2], в которых показано корригирующее влияние препаратов нуклеотидной природы при нарушениях, обусловленных как ослаблением функций иммунной системы, так и избыточной их активностью.

Список литературы

1. Ершов Ф.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). – М.: Гоэтар-Медиа, 2005. – 368 с.

2. Каплина Э.Н., Вайнберг Ю.П. Деринат – природный иммуномодулятор для детей и взрослых. – М.: Научная книга, 2005. – 213 с.

3. Корнева Е.А., Шанин С.Н., Рыбакина Е.Г. Интерлейкин 1 в реализации стресс-индуцированных изменений функций иммунной системы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 3. – С. 292–302.

4. Рыбакина Е.Г., Корнева Е.А. Физиологическая роль интерлейкина 1 в механизмах развития стрессорной реакции // Медицинский Академический Журнал. – 2002. – Т.2, № 2. – С. 4–17.

5. Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при синдроме хронической усталости в эксперименте / Е.Г. Рыбакина, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева, Е.А. Корнева // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95. – № 12. – С. 1324-1335.

6. Серебряная Н.Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа. // Иммунология. – 2010. – Т. 31, №. 5. – С. 273–281.

7. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family / M.P. Abbracchio, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, M.T. Miras-Portugal, B.F. King, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Wiesman, G. Burnstock // Trends. Pharmacol. Sci. – 2003. – Vol. 24, №2. – P. 52–55.

8. Dinarello C.A. Interleukin 1: a proinflammatory cytokine // Inflammation: Basic principles and clinical correlates, 3rd ed. / ed. Gallin J.I., Snydrman R. – Philadelphia: Lappincott Williams & Wilkins. – 1999. – P. 443–461.

9. Heuser I., Lammers C.-H. Stress and the brain // Neurobiol. Aging. – 2003. – № 2. – P. S69–S76.

10. Hormone response to stress in rat strains of different susceptibility to immunologic challenge / L. Macho, J. Rovensky, R. Kvetnansky, Z. Radikova, M. Fickova, S. Zorad // Endocr. Regul. – 2008. – Vol. 42, №1. – P. 23–28.

Рецензенты:

Дыбан П.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной генетики НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург;

Кокряков В.Н., д.б.н., профессор кафедры биохимии Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 09.12.2011.