

На правах рукописи

**ГРИГОРЬЕВ ИВАН ИВАНОВИЧ**

**ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА И  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ЗВЕНА СИСТЕМЫ  
КРОВИ К ДЕЙСТВИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 β**

03.00.13 – физиология

14.00.36 – аллергология и иммунология

**Диссертация**

на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

**Тюмень 2007**

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Челябинский Педагогический Университет» и Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный университет».

**Научные руководители:**

Доктор биологических наук, профессор Шибкова Дарья Захаровна  
Доктор медицинских наук, Цейликман Ольга Борисовна

**Официальные оппоненты**

доктор медицинских наук, профессор Дуров Алексей Михайлович  
доктор медицинских наук, профессор Гусев Евгений Юрьевич

**Ведущая организация:** Российский государственный медицинский университет  
Защита состоится «26» мая 2007г. в 13 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.274.07 при Тюменском государственном университете по адресу 625043, г. Тюмень, ул. Пирогова3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского государственного университета

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_. 2007г.

Учёный секретарь диссертационного  
совета, доктор биологических наук,  
профессор

Е.А.Чирятьев

## ВВЕДЕНИЕ.

### Актуальность проблемы

Взаимодействия между иммунной, нервной и эндокринными системами при заведомо не антигенных воздействиях активно исследуются на протяжении последних десятилетий (Blalock J.E., Smith E.M., 1985; Корнева Е.А.,1993; Волчегорский И.А. и соавт., 1998, 1999, 2000; Черешнев В.А и соавт., 2002). Одним из важнейших обобщений в области иммунофизиологии является концепция о роли иммунной системы в выборе адаптационной стратегии (Волчегорский И.А. и соавт., 1998,1999,2000; Колесников О.Л., 1998., Цейликман В.Э.,1998). Резистентная стратегия адекватна активному преодолению действия экстремального раздражителя (реализация реакции «борьба-бегство»), её эффективность обеспечивается максимизацией функций, усилением основного обмена и катаболических процессов. Роль иммунной системы в развитии резистентной стратегии адаптации сводится к цитокино-зависимой активации гипоталамо-гипофизарно – надпочечниковой системы (ГГАС)

Так, секретируемые лейкоцитарными клетками IL-1, IL-6, IL-2, ФНО проникают из циркулирующей крови в ЦНС вследствие увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Кроме того, поступление цитокинов из циркуляции в головной мозг может проходить через фенестрированный эндотелий *organicum vasculosus* и *lamina terminalis* (Katsnura J. e. a., 1989; Strober W. e. a., 1988; Sternberg E. e. a., 1995; Kapkala L. e. a., 1995; De Souza E., 1993; Lightman A. e. a., 1993). В иммунных механизмах активации гипоталамо-гипофизарно – надпочечниковой системы заметную роль играет IL-1. Причём IL1 $\beta$  как цитокин, находящийся в циркуляции, привносит в стимуляцию ГГАС гораздо более заметный вклад, чем IL-1 $\alpha$ , который является мембрано-ассоциированным цитокином (Kapkala L. e. a., 1995). Основным механизмом, через который IL-1 реализует свои ГГАС-стимулирующие эффекты, связан с активацией секреции КРФ из нервных терминалей *median eminence* (Berkenbosh F. e. a., 1987; Chover-Gonzalez A.J. t. a., 1994; Minami M. e. a., 1991; Ranshoff B.M., 1987). Кроме того, IL-1 потенцирует секрецию аргинин-вазопрессина из терминалей *median eminence* (Sternberg E., Licinio J., 1995).

Использование толерантной стратегии адаптации целесообразно в ситуациях, когда непреодолимо действие экстремального раздражителя чрезмерно и непреодолимо. Тогда поведенческие реакции становятся пассивными, снижается потребление кислорода, замедляются катаболические процессы. В этом случае, цитокины как эффекторы

толерантной стратегии действуют на органы-мишени. На уровне органов мишеней направленность эффектов IL-1 и других секреторных продуктов лейкоцитарных клеток отличается от характера эффектов, оказываемых на нейро-эндокринные клетки (Волчегорский И.А. и соавт., 1998). Так IL-1 обладает способностью снижать чувствительность органов-мишеней к действию глюкокортикоидов и катехоламинов (Рыбакина Е.Г., 1991, Симбирцев А.С., 1992). Таким образом, антикортикостероидное действие секреторных продуктов лейкоцитарных клеток можно рассматривать как один из вероятных механизмов постстрессорной иммуностимуляции.

Полярные типы адаптационных стратегий разнонаправлено влияют на иммунный ответ. В настоящее время имеются данные об иммуносупрессивном действии стрессорных воздействий с доминирующей резистентной стратегией адаптации (Волчегорский И.А. и соавт., 2005). Также получены данные об иммуностимулирующих эффектах при стрессорных воздействиях с доминирующей толерантной стратегией (Волчегорский И.А. и соавт., 1998, 1999.,2000; Колесников О.Л., 1998., Цейликман В.Э.,1998; Волчегорский И.А. и соавт., 2000). Однако механизмы, обуславливающие развитие этих иммуотропных эффектов остаются неизвестными. Известно, что цитокины активно вовлечены в формирование иммунного ответа. Но вместе с тем, имеются данные о том, что содержание цитокинов повышено как при доминировании резистентной так и толерантной адаптационной стратегии (Волчегорский И.А. и соавт., 1998, 2002., 2003; Цейликман В.Э. и соавт., 2005). Вполне возможно, что при различном характере адаптационной стратегии в противоположном направлении будет меняться чувствительность к провоспалительным цитокинам. Однако на сегодняшний день этот вопрос остаётся мало изученным.

**Целью настоящего исследования являлось:** Сопоставление чувствительности к иммунизации с чувствительностью лейкоцитарного звена системы крови к действию рекомбинантного IL-1 $\beta$  в условиях стрессорных воздействий с различным типом адаптационных стратегий

**Задачи исследования:**

1. Изучить иммунный ответ при стрессорных воздействиях с различным типом адаптационных стратегий .
2. Изучить чувствительность лейкоцитарного звена системы крови к рекомбинантному IL-1 $\beta$ . у стрессорных воздействий с различным типом адаптационных стратегий .
3. Исследовать соотношение между апоптозом и пролиферацией в вилочковой железе. у стрессорных воздействий с различным типом адаптационных стратегий .
4. Изучить повторных 1 часовых иммобилизаций на перераспределение лейкоцитарных

клеток между различными компартаментами системы крови.

5. Изучить влияние повторных 1 часовых иммобилизаций на вызванную введением рекомбинантного IL-1 $\beta$  гипоплазию лимфоидной ткани.

#### **Теоретическое значение работы**

Обосновано представление о цитокин-зависимых механизмах усиления и снижения выраженности реакции клеточного звена иммунитета при повторных стрессорных воздействиях.

#### **Научная новизна**

Повторные стрессорные воздействия, сопровождающиеся усилением иммунной реактивности, характеризуются повышенной чувствительностью лейкоцитарного звена системы крови к действию рекомбинантного IL-1 $\beta$ . Для повторных стрессорных воздействий, со сниженным уровнем иммунной реактивности характерна десенситизация лейкоцитарного звена системы крови к действию рекомбинантного IL-1 $\beta$ . Установлено, что при ежедневных иммобилизациях гипоплазия вилочковой железы обусловлена индукцией апоптоза, а гипоплазия селезёнки развивается за счёт угнетения пролиферативной активности. Впервые обнаружено, что стрессорная гипоплазия костного мозга и селезёнки сопровождается снижением количества кариоцитов, которые содержат одновременно экстрануклеолярные и интрануклеолярные депозиты нитрата Ag. В тимусе, костном мозге и селезёнке обнаружено постстрессорное снижение количества экстрануклеолярных и интрануклеолярных депозитов Ag, приходящихся на одну клетку.

#### **Практическое значение**

Результаты исследования могут быть использованы для разработки новых подходов к коррекции стрессорной иммуносупрессии и лабораторных тестов для определения чувствительности к цитокинам.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Повышенная чувствительность лейкоцитарного звена системы крови к рекомбинантному IL-1 сопряжена с постстрессорным усилением выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа.
2. Сниженная чувствительность лейкоцитарного звена системы крови к рекомбинантному IL-1 сопряжена с постстрессорным угнетением выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа.
3. Наблюдаемая при хроническом стрессе гипоплазия иммунных органов обусловлена как активацией апоптоза с ингибированием пролиферации, так и усилением миграции лейкоцитарных клеток в кровотоки

### **Апробация работы**

Основные результаты исследования доложены на III конференции иммунологов Урала (Челябинск, 2003) Всероссийской научной конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск.,2004), III итоговой научно-практической конференции молодых учёных Челябинской государственной медицинской академии (Челябинск., 2005) , IV конференции иммунологов Урал (Уфа, 2005), иммунологическом форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2006), научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань 2006) , 16 Европейском конгрессе по иммунологии (Paris 2006)

**Публикации.** По результатам проведённых исследований опубликованы 8 печатных работ из них 1 статья в рецензируемом журнале.

**Структура и объём диссертации:** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, 2 глав, касающихся результатов исследования, заключения, выводов. Список литературы состоит из 366 источников, в том числе 190 на иностранном языке

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста. Иллюстрирована 23 таблицами и 8 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Моделирование изучаемых состояний**

Исследование выполнено на 145 лабораторных крысах популяции Вистар массой 180 - 250 г обоего пола. Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках при комнатной температуре, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам. За 24 часа до опыта животным прекращали подачу пищи при неограниченном доступе к воде. Для воспроизведения иммунотропных эффектов хронического стресса использовали два варианта периодического воздействия одночасовыми иммобилизациями, которые осуществлялись путём фиксации животного за конечности на спине с применением для этих целей прямоугольных планшет из фанеры. Первый воспроизводился путём трехкратных одночасовых иммобилизаций с интервалом между воздействиями в 24 часа. Второй вариант повторных стрессорных воздействий воспроизводили четырехкратными одночасовыми иммобилизациями с интервалом в 72

часа между отдельными эпизодами. Выбор этих режимов хронического стресса основан на данных литературы о различном характере иммунного ответа в ответ на дополнительное воздействие аллогенным антигеном (Волчегорский И.А и соавт.,1998; Цейликман В.Э.,1998; Колесников О.Л.,1998; Волчегорский И.А. и соавт., 2005). Через 24 часа после завершения стрессирования животные подвергались иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) или получали рекомбинантный IL-1 $\beta$ .

Животных иммунизировали тимусзависимым антигеном – ЭБ. Перед использованием ЭБ трижды отмывали в физиологическом растворе. Учитывая, что доза  $1 \times 10^8$  ЭБ является оптимальной как для подкожного, так и внутрибрюшинного введения антигена, для индукции системного и локального иммунного ответа использовали данную дозу ЭБ. В качестве разрешающей дозы для подкожной иммунизации использовали  $5 \times 10^7$  клеток. В случае индукции гуморальной и клеточной составляющей иммунного ответа сначала проводили внутрибрюшинную иммунизацию, а через 4 дня осуществляли повторную иммунизацию, а в случае индукции клеточноопосредованного иммунного ответа антиген вводили двукратно, с интервалом в 4 дня под апоневроз стопы животных. рекомбинантный человеческий IL-1 $\beta$  (Беталейкин, Betaleukinum, hrIL-1  $\beta$ ; ГНЦ РФ ГосНИИ особо чистых препаратов, г. Санкт-Петербург; препарат был любезно предоставлен профессором А.С.Симбирцевым) с удельной биологической активностью  $10^8$  ед/мг белка, который разводили изотоническим раствором NaCl и вводили внутрибрюшинно в дозе  $6,5 \times 10^5$  ед/кг . Объем вводимой жидкости составил 1 мл на 100 г массы животного. Контрольные группы получали эквивалентное по объёму количество хлорида натрия.

Лейкоцитарную формулу изучали в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе (проводился подсчет не менее чем 200 клеток). Мазки периферической крови, так же как мазки-отпечатки костного мозга (КМ) и селезёнки, перед окраской фиксировали метанолом.

Кариоциты КМ, лимфоидных органов и лейкоциты крови, подсчитывали в камере Горяева после ресуспендирования в 0,1% растворе метиленового синего в 3% уксусной кислоте.

Для оценки соотношения между темпами апоптоза и пролиферации ядродержащие клетки в тимусе, костном мозге и селезёнке окрашивали йодистым пропидием (Sigma, USA) и подвергали проточной цитометрии (проточный цитофлюориметр Facs Calibur, Becton Dickinson, USA).

Содержание циркулирующих цитокинов определяли иммуноферментным методом на планшетном фотометре MultiskanPlus (Labsystems) с использованием коммерческих

наборов фирмы BIOSORCE. Уровень кортикостерона в сыворотке оценивали флюорометрическим микрометодом (Балашов Ю.Г., 1990).

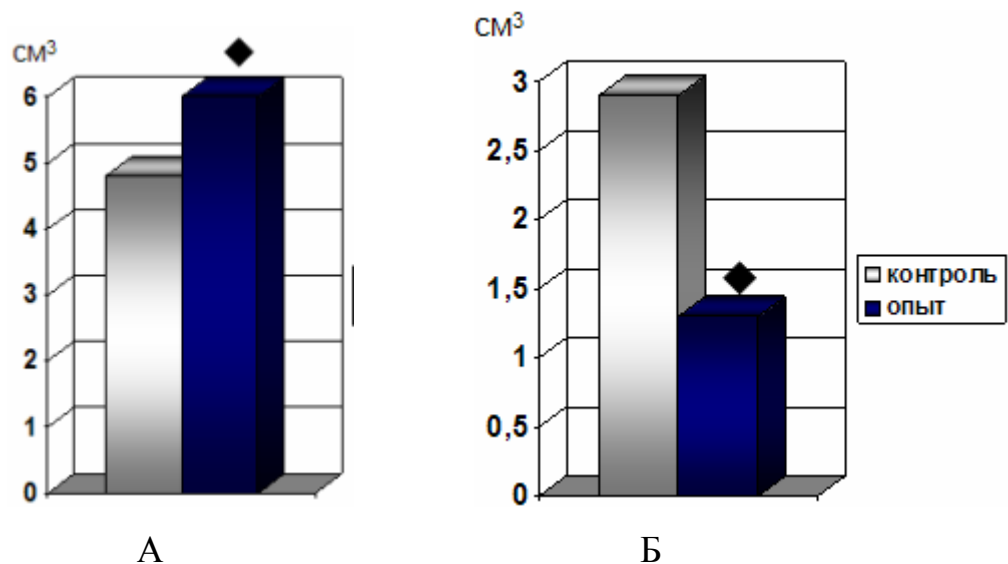
Результаты обработаны методами вариационной статистики и выражены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). О различиях в распределении судили по критерию Колмогорова-Смирнова ( $\lambda$ ). Оценка достоверности различий осуществлялась с помощью непараметрических критериев (U- критерия Вилкоксона–Манна-Уитни; WW- критерия Вальда-Вольфовица,  $\lambda$  - одностороннего критерия Колмогорова-Смирнова), параметрического критерия Ньюмена-Келса - НК (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA). Статистические взаимосвязи изучали при помощи непараметрического корреляционного анализа по Спирмену ( $r_s$ ) и Кенделлу ( $r_k$ ). Для обработки результатов исследований использовали пакет прикладных программ «Statistica 6.0 for Windows».

### **Результаты и обсуждение**

На первом этапе проводили иммунизацию животных предвдорительно подвергнутым ежедневным (Им1) и редкочередующимся (группа Им2) иммобилизациям. Для группы Им1 характерно толерантная стратегия адаптации что прежде всего проявлялась в повышенной устойчивости к гипоксии (Волчегорский И. И. и соавт. 1998). апротив, для группы Им2 характерно преобладание резистентной стратегии, что пролявлялось в сниженной устойчивости к гипоксии (Волчегорский И. А. 2002, Целикман В. Э. 2005)

Как видно из рисунка №1, после завершения иммунизации у животных, подвергнутых ежедневными иммобилизациям наблюдалось усиление реакции ГЗТ. При этом количество АОК не отличалось достоверно от контроля. Таким образом, при доминировании толерантной стратегии адаптации усиливается клеточное звено иммунитета, что хорошо согласуется с полученными ранее результатами (Волчегорский И.А. и соавт., 1998; Цейликман В.Э.,1998; Колесников О.Л.,1998). При редко чередующихся иммобилизациях количество ГЗТ снижено в 2 раза. Однако, при этом уровень АОК не отличался статистически значимо от контрольных значений. Таким образом, реакция ГЗТ, будучи показателем, характеризующим клеточное звено иммунитета, может выступать в роли своеобразного «сенсора» адаптационной стратегии.





**Рисунок 1.** Влияние повторных стрессорных воздействий на выраженность реакции ГЗТ

Примечания: А) Им 1; Б) Им2

◆ - достоверность различий между группами контроль и опыт.

Известно, что реакция ГЗТ является одной из моделей иммуновоспалительного процесса. Поэтому представляется целесообразным сопоставить иммулотропные эффекты хронического стресса с изменениями как содержания провоспалительных цитокинов, так и с чувствительностью лейкоцитарного звена системы крови к действию рекомбинантного IL-1 $\beta$ .

Как видно из таблицы №1 при ежедневных иммобилизациях наблюдалось достоверное повышение содержания циркулирующего IL-6 при неизменном содержании циркулирующего IL-1. Для редко чередующихся иммобилизаций, содержание циркулирующих IL-1 и IL-6 не отличалось достоверно от контрольных значений. Таким образом, в ходе исследований не удалось обнаружить общий характер между изменением содержания провоспалительных цитокинов и выраженностью реакции ГЗТ для стрессорных воздействий с различным типом адаптационных стратегий. Поэтому в дальнейших исследованиях мы сосредоточили своё внимание на постстрессорных изменениях чувствительности к провоспалительным цитокинам. С этой целью мы использовали препарат человеческого рекомбинантного IL-1 $\beta$  (pIL-1 $\beta$ ), который вводили в дозе  $6,5 \cdot 10^5$  ед/кг массы животным не подвергавшимся предварительным стрессорным воздействиям (группа «pIL-1 $\beta$ »), животным получавшим цитокиновый препарат через 24 часа после завершения ежедневных 1 часовых иммобилизаций (группа «Им1+ pIL-1 $\beta$ ») и животным получавшим цитокиновый препарат через 24 часа после завершения редко чередующихся 1 часовых иммобилизаций (группа «Им2 + pIL-1 $\beta$ »).

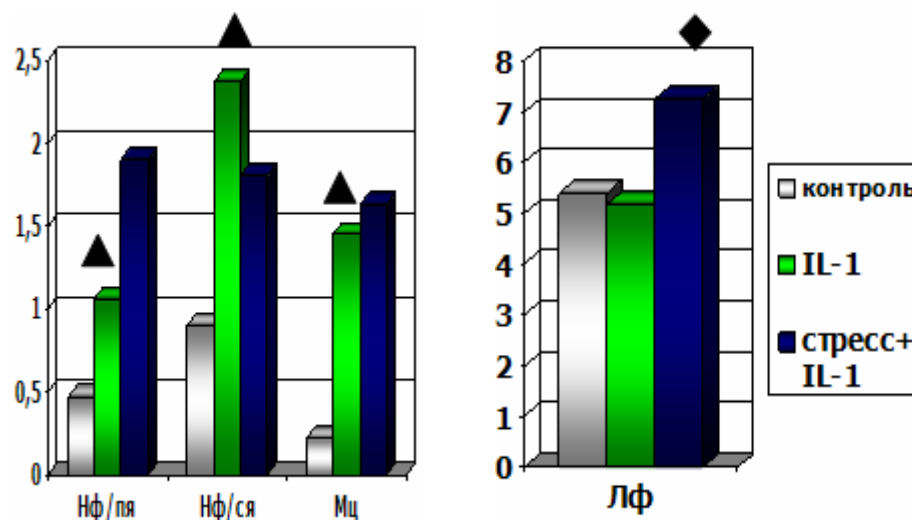
**Содержание циркулирующих IL-1 и IL-6 у крыс популяции Вистар через 24 часа после завершения последней иммобилизации**

<b>Группы</b>	<b>Контроль</b>	<b>Стресс (Им1)</b>
<b>2 IL-1 (пг/мл)</b>	51,33±6,2 n=6	49,8±8,03 n=6
<b>3. IL-6 (пг/мл)</b>	0,26±0,13 n=6	0,66±0,18 n=6 P=0,03 (U)

Введение pIL-1 $\beta$  вызвало развитие лейкоцитоза. Это проявлялось в увеличении на 34% общего количества лейкоцитов (P=0,02 NK), в 2,24 раза повысилось содержание палочкоядерных нейтрофилов (P=0,019U), в 2,63 раза сегментоядерных (P=0,019U). Содержание циркулирующих моноцитов в 6 раз превысило контрольный уровень (P=0,0019U). Этим сдвигам соответствовала гипоплазия костного мозга, которая проявлялась в снижении на 40% количества ЯСК в органе (P=0,02U). При этом наблюдалось заметное снижение содержания костномозговых нейтрофилов и моноцитов. Таким образом, в группе «pIL-1 $\beta$ » развитие костномозговой гипоплазии обусловлено миграцией в циркулирующий кровоток нейтрофилов и моноцитов. Вместе с тем, определённый вклад в развитие гипоплазии органа может принести и угнетение пролиферации и дифференцировки миелокариоцитов. Это хорошо согласуется с фактом снижения количества клеток с внеядрышковыми и внутриядрышковыми депозитами Ag. Интересно отметить, введение pIL-1 $\beta$  помимо костного мозга повлекло за собой гипоплазию других иммунных органов. Так, через 24 часа после введения животным цитокинового препарата, наблюдалась гипоплазия вилочковой железы и селезёнки. Полученные результаты ещё раз подтверждают данные других авторов о том, что в условиях *in vivo* и *in vitro* IL-1 оказывает различное влияние на лимфоидные клетки (Sibiryak S.V.e.a., 2004).

10<sup>9</sup> кл/л

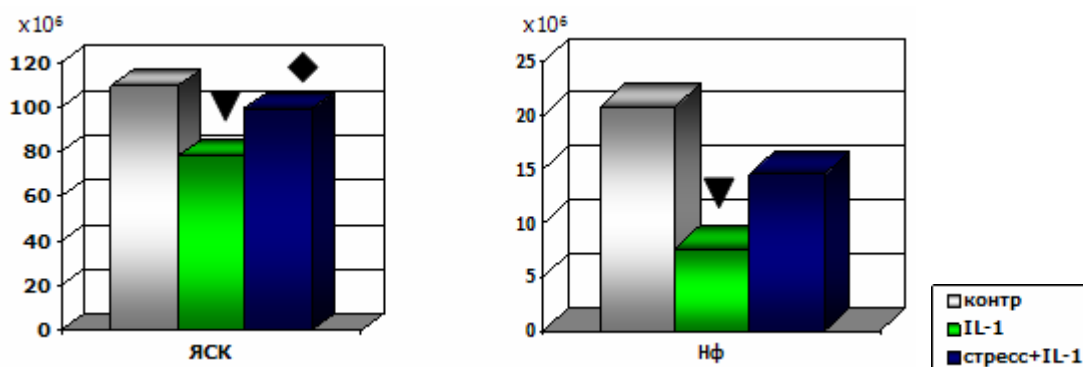
10<sup>9</sup> кл/л



**Рисунок 2.** Влияние предварительных ежедневных иммобилизаций на рIL-1 $\beta$  –зависимые изменения лейкоцитарной формулы

- ▼ - достоверность различий между группами IL-1 и контроль
- ◆ - достоверность различий между группами стресс+IL-1 и IL-1

Индукцированная рIL-1 гипоплазия лимфоидных органов объясняется феноменом цитокин-зависимой активации ГГАС. В частности, этот феномен проявлялся в резком увеличении содержания кортикостерона через 12 часов после введения беталейкина (Sibiryak S.V., 2004; Ахматов А.Т., 2004). В селезёнке, также как и в костном мозге, развитию гипоплазии сопутствовало снижение в 3 раза количества спленоцитов одновременно содержащих внутридрышковые и внедрышковые депозиты Ag, а вилочковой железе в 1,5 раза уменьшилось содержание тимоцитов с внедрышковыми депозитами Ag. В связи с этим уместно отметить, что клетки с подобным типом распределения депозитов Ag обладают наиболее высоким уровнем экспрессии генов рРНК (Crocker J., 1989). Интересно отметить, что в группе «рIL-1 $\beta$ » одновременно снижено количество пролиферирующих тимоцитов и содержание тимоцитов, находящихся в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазе клеточного цикла (). Подобные сдвиги могут иметь глюкокортикоид-зависимый характер, что хорошо согласуется с данными, полученными ранее в лаборатории С.В. Сибиряка (Sibiryak S.V.e.a., 2004)



**Рисунок 3 .** Влияние предварительных ежедневных иммобилизаций на pIL-1 $\beta$  – зависимые изменения показателей миелограммы.

- ▼ - достоверность различий между группами IL-1 и контроль
- ◆ - достоверность различий между группами стресс+IL-1 и IL-1

Интересно отметить, что исследованные режимы повторных иммобилизаций сами по себе сопровождалось появлением лейкотропных эффектов сопоставимых с отмеченными ранее эффектами данного цитокинового препарата. Оба исследованных режима сопровождалось развитием лейкоцитоза. И в том и в другом случае возросло содержание циркулирующих нейтрофилов. Так при Им1 наблюдалось общее содержание циркулирующих нейтрофилов было в 2 раза повышено по сравнению с контролем. При этом у стрессированных животных снижалась выраженность респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Это проявлялось в снижении, как активности, так и интенсивности индуцированного НСТ-теста, определяемого по уровню восстановления нитросинего тетразолия в диформаза в присутствии частиц латекса. Необходимо учесть, что снижение активности радикал продуцирующих фагоцитарных клеток крови реализуется на фоне нейтрофилёза. Упомянутый факт характеризует стереотипную для нейтрофилов обратную зависимость между количеством находящихся в циркуляции клеток и уровнем их функциональной активности. Для стрессированных крыс характерно снижение количества ядросодержащих клеток (ЯСК) костного мозга на 41% (P=0,028U). Анализ миелограммы показал, что в первую очередь это обусловлено уменьшением количества малодифференцированных клеток грануло-моноцитарного ряда и лимфоцитов. Кроме того, наблюдалось постстрессорное снижение количества костномозговых моноцитов/макрофагов. Возникает вопрос о механизме постстрессорной гипоплазии костного мозга. С одной стороны она может быть связана с избыточной миграцией клеток

костного мозга в кровь. С другой стороны её причиной может быть ингибирование функциональной активности клеток пролиферативного пула и усиление апоптоза.

Анализ распределения депозитов Ag в ядрах костномозговых клеток свидетельствует об угнетении пролиферации коммитированных клеток. Установлено, что через 24 часа после завершения иммобилизационного стресса в костном мозге увеличилось относительное содержание покоящихся клеток, в которых выявляются гранулы Ag только внутри ядрышек. Одновременно снизилась относительная доля клеток, характеризующихся наличием внутриядрышковых депозитов Ag в сочетании со свободно диспергированных по ядру Ag-NORS. Следует отметить, что для этой клеточной субпопуляции также характерно снижение и абсолютного значения показателя (на  $10^6$  клеток костного мозга).

Поэтому мы склонны рассматривать снижение количества миелонуклеаров с вне и внутри ядрышковыми Ag-NORS как фактор, определяющий развитие гипоплазии костного мозга. Анализ данных по проточной цитофлуориметрии, показал, что у стрессированных животных увеличилось в 2,5 раза количество апоптотических миелонуклеаров ( $P=0,021WW$ ). За счёт этого возросло соотношение между апоптотическими и пролиферирующими клетками костного мозга.

**Таблица 2**

**Влияние повторных стрессорных воздействий на уровень апоптоза и на содержание покоящихся и пролиферирующих миелонуклеаров**

Группы	ПИК М1 СУБ G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	ПИК М2 S+G <sub>2</sub> +M	ПИК М3 G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>
<b>1. Контроль Вистар, n=5</b>	1,55±0,46	11,87±1,13	71,52±7,01
<b>2. Стресс Вистар, n=7</b>	3,75±0,85 ( $P=0,021WW$ )	14,5±1,65	67,66±2,21 ( $P=0,044WW$ )

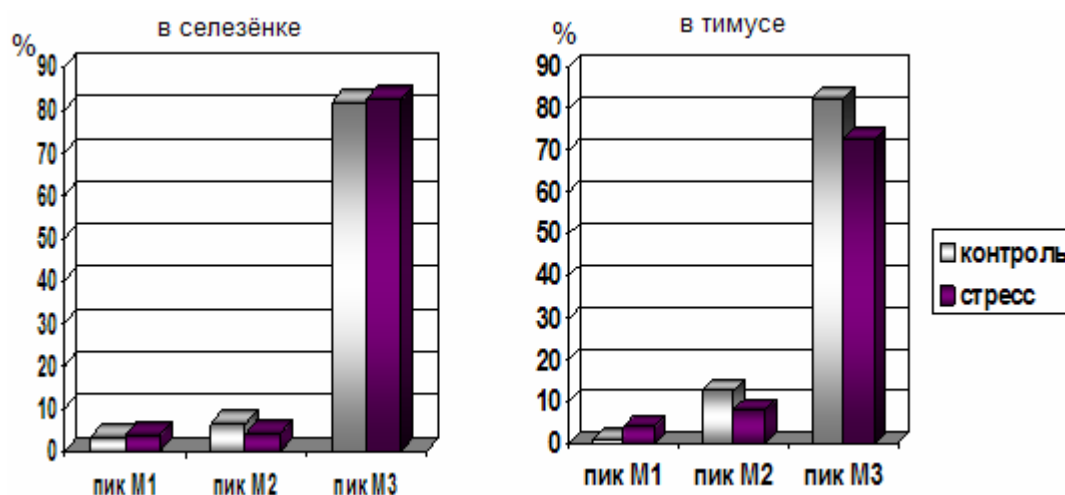
Примечание: В этой таблице пик М1 (СУБ G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) представлен гипохромными (апоптотическими) клетками; пик М2 (S+G<sub>2</sub>+M) покоящимися клетками, пик М3 (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) суммой клеток, находящихся в S и G<sub>2</sub> фазах клеточного цикла и митотически активных миелонуклеаров.

Для Им2 в 3,6 раза выросло количество палочкоядерных нейтрофилов ( $P=0,006U$ ), при статистически недостоверной тенденции к увеличению содержания сегментоядерных нейтрофилов. В целом, суммарное содержание палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов повысилось в 2,3 раза ( $P=0,008U$ ). Таким образом, при редко чередующихся иммобилизациях нейтрофилёз формируется за счёт палочкоядерных форм, которые характеризуются низкой (по сравнению с сегментоядерными) функциональной активностью. Вероятно, по этой причине уровень фагоцитарной активности и интенсивность респираторного взрыва у циркулирующих фагоцитов не отличались достоверно от контрольных значений.

Для редко чередующихся повторных иммобилизаций не характерно гипоплазирующее действие по отношению к костному мозгу. При этом большинство показателей исследованных не отличались достоверно от контроля. Пожалуй, наиболее характерной особенностью действия анксиогенного стресса на костный мозг - это увеличение относительного содержания малодифференцированных клеток грануло-моноцитарного ряда при одновременном снижении относительного содержания клеток эритроидного ряда. Установлено, что через 24 часа после завершения иммобилизационного стресса как у крыс линии Вистар, увеличилось количество покоящихся клеток, в которых выявляются ядрышки целиком или гранулы Ag внутри них. Одновременно снизилось количество клеток, характеризующихся наличием депозитов Ag внутри ядрышек, а также свободно диспергированных по ядру Ag-NORS.

В отличие от группы  $rIL-1\beta$ , у исследованных режимов повторных иммобилизаций отсутствовал моноцитоз. При этом в обеих группах стрессированных животных зарегистрировано наличие лимфоцитоза. Тем не менее, как при ежедневных, так и при редко чередующихся иммобилизациях отмечены гипоплазия вилочковой железы и селезёнки. В вилочковой железе стрессированных крыс (группа Им1) одновременно наблюдались и индукция апоптоза и угнетение пролиферации тимоцитов, что и обусловило гипоплазию органа. Уместно напомнить, что в селезёнке и костном мозге после завершения стрессорных воздействий повышалось относительное содержание клеток с внеядрышковыми депозитами Ag-NORS. Вероятно, в вилочковой железе индукцию апоптоза прежде всего предопределяет «арест клеточного цикла» у этой субпопуляции тимоцитов. Не исключено, что помимо индукции апоптоза стрессорные механизмы развития инволюции тимуса реализуются и путём усиления миграции Т-лимфоцитов из вилочковой железы. В пользу этого свидетельствует и наблюдаемый через 24 часа после завершения иммобилизации лимфоцитоз. В селезёнке в 2,5 раза снижено количество ЯСК, и во столько же раз было уменьшено количество лимфоидных клеток в

органе. Одновременно увеличилось количество поступивших в селезёнку нейтрофилов. Так же как и в костном мозге наблюдалось увеличение количества клеток с внутриядрышковыми депозитами Ag-NORS, при одновременном снижении количества клеток, у которых присутствие внутриядрышковых депозитов Ag-NORS сочетается с внеядрышковыми депозитами. Кроме того, было обнаружено снижение депозитов Ag-NORS в пределах одной клетки. Результаты исследований свидетельствуют о том, что для данного режима иммобилизационного стресса вовсе не характерно проапоптогенное действие по отношению к селезёнке. Тем не менее, у стрессированных крыс содержание пролиферирующих спленоцитов (клетки в S+G<sub>2</sub>+M фазах) было снижено на 15 % по сравнению с контролем (P=0,047U).



**Рисунок4.** Влияние ежедневных иммобилизаций на уровень апоптоза и показатели клеточного цикла в селезёнке и в тимусе

**пик M1** (СУБ G0/G1) представлен гипохромными (апоптотическими) клетками;

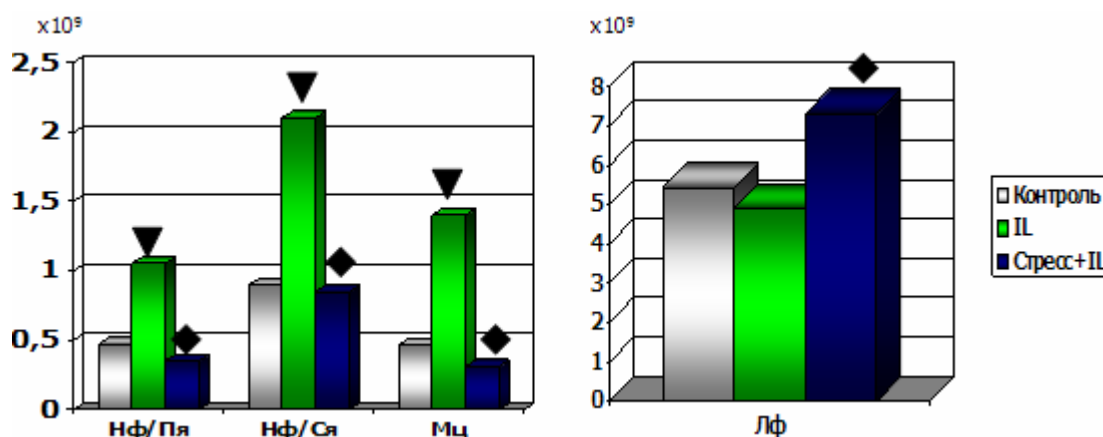
**пик M2** (S+G<sub>2</sub>+M) суммой клеток, находящихся в S и G<sub>2</sub> фазах клеточного цикла и митотически активных спленоцитов и тимоцитов

**пик M3** (G0/G1) покоящимися клетками.

Редко чередующиеся иммобилизации привели к развитию гипоплазии селезёнки. Так, через 24 часа после завершения повторных стрессорных воздействий количество ЯСК снизилось на 28 % у крыс линии Вистар (P=0,01U) Развитие гипоплазии происходило за счёт снижения содержания лимфоидных клеток в органе. При этом в 3 раза возросло содержание нейтрофилов. У стрессированных крыс достоверно снижалось только количество тех спленоцитов, у которых одновременно присутствуют внутриядрышковые и внеядрышковые депозиты Ag. Кроме того, было обнаружено уменьшение экстрануклеарных Ag-NORS в пределах одной клетки. Таким образом, в селезёнке развитие гипоплазии органа синхронизировано со снижением количества спленоцитов с внутриядрышковыми и внеядрышковыми депозитами Ag. После завершения повторных стрессорных воздействий, зарегистрирована инволюция

вилочковой железы. Одновременно снижалось количество тимоцитов с внеядрышковыми депозитами Ag. Тем не менее, у них всё же осталось неизменным (по сравнению с контролем) содержание митотически активных тимоцитов. Таким образом, через 24 часа после завершения последнего стрессорного эпизода, в исследованных лимфоидных органах наблюдалось стереотипное событие – развитие гипоплазии с одновременным снижением содержания клеток в которых присутствуют внеядрышковые и внутриядрышковые депозиты Ag.

Предварительные ежедневные стрессорные воздействия усилили выраженность IL-1-зависимого лейкоцитоза. Так, в группе «Им1+ рIL-1β» общее количество циркулирующих лейкоцитов на 30 % (P=0,02U) превысило значение, характерное для группы «рIL-1β». Анализ лейкоцитарной формулы показал, что усугубление лейкоцитоза обусловлено увеличением уровня циркулирующих лимфоцитов. Подобные изменения могут быть связаны либо с усилением лимфопоэза, либо с усилением миграции лимфоидных клеток в кровотоки.

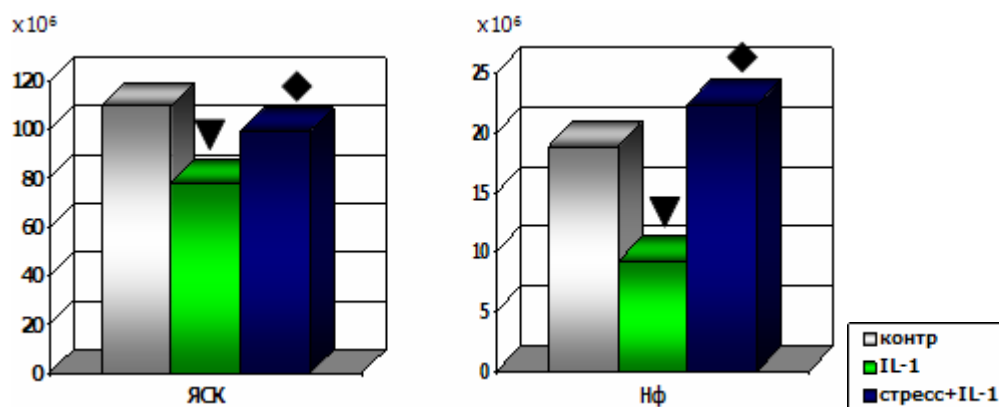


**Рисунок5** Влияние предварительных редко чередующихся иммобилизаций на рIL-1β –зависимые изменения лейкоцитарной формулы

- ▼ - достоверность различий между группами IL-1 и контроль
- ◆ - достоверность различий между группами стресс+IL-1 и IL-1

Предварительные стрессорные воздействия не повлияли на характер IL-1 зависимых изменений в миелограмме. Но при этом в 2,5 раза возросло количество миелокариоцитов с внутриядрышковыми депозитами Ag и более чем в 3 раза выросло содержание клеток костного мозга с внеядрышковыми депозитами Ag. Между тем, количество миелокариоцитов в которых содержатся как внутриядрышковые, так и внеядрышковые депозиты Ag не изменилось достоверно по сравнению с группой «рIL-1β».





**Рисунок 6.** Влияние предварительных редко чередующихся иммобилизаций на рIL-1 $\beta$ -зависимые изменения показателей миелограммы

▼ - достоверность различий между группами IL-1 и контроль

◆ - достоверность различий между группами стресс+IL-1 и IL-1

Предварительные стрессорные воздействия смягчали - рIL-1 $\beta$  зависимую гипоплазию селезёнки, не меняя при этом масштабы инволюции вилочковой железы. У животных группы «стресс+рIL-1 $\beta$ » количество ЯСК в селезёнке было в 2, 29 раза больше чем в группе «IL-1». При этом в группе «стресс+рIL-1 $\beta$ » в 5 раз возросло содержание спленоцитов с внутридрышковыми депозитами Ag и в 2,5 раза спленоцитов с внедрышковыми депозитами Ag. Вероятно, усугубление цитокин-зависимого лейкоцитоза связано со спленопротекторным действием повторных иммобилизаций. В тимусе стрессированных животных возросло содержание только кариоцитов с внутридрышковыми депозитами Ag. Вероятно, этого оказалось не достаточно для того, чтобы купировать рIL-1 $\beta$  зависимую инволюцию вилочковой железы.

Предварительные редко чередующиеся стрессорные воздействия заметно ограничили уровень рIL-1 $\beta$ -зависимого нейтрофилёза и моноцитоза (рис.5) Так, у животных группы «Им2+ рIL-1 $\beta$ » по сравнению с группой «рIL-1 $\beta$ » 3 раза снижено количество палочкоядерных нейтрофилов и в 2,5 раза количество сегментоядерных нейтрофилов. Одновременно в 4,5 раза снизилось содержание моноцитов. Наблюдаемые изменения обусловлены ограничением мобилизации нейтрофилов и моноцитов из костного мозга. Так, введение IL-1 после предварительных стрессорных воздействий сопровождалось заметным приростом содержания нейтрофилов в костном мозге. При этом в группе «Им2+ рIL-1 $\beta$ » количество нейтрофилов повысилось в 3 раза по сравнению с группой «рIL-1 $\beta$ » (P=0,0039U). Таким образом, предварительные стрессорные воздействия эффективно ограничивают IL-1 - зависимую мобилизацию костномозговых нейтрофилов в кровотоки. Также как и при ежедневных иммобилизациях, после введения IL-1 стрессированным животным наблюдалось увеличение содержания миелонуклеаров с внутридрышковыми и миелонуклеаров с внедрышковыми депозитами. Несмотря на

столь заметное ограничение мобилизации костно мозговых клеток, в группе «Им2+ рIL-1β» не удалось обнаружить ограничение рIL-1β-зависимого лейкоцитоза. Это связано с увеличением количества циркулирующих лимфоцитов у животных получавших рIL-1 β после завершения повторных стрессорных эпизодов. В свою очередь, потенцирование лимфоцитоза может быть связано со способностью редко чередующихся стрессорных воздействий смягчать рIL-1 β зависимую гипоплазию тимуса. Как видно из рисунка №4.5. у животных группы «Им2+ рIL-1β» количество ЯСК в тимусе было на 40% больше чем в группе «рIL-1 β» (P=0,028U). При этом увеличилось количество тимоцитов, находящихся в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазах клеточного цикла. Одновременно наблюдалось увеличение у стрессированных животных количества тимоцитов с внутриядрышковыми депозитами Ag. Следует отметить, что в отношении селезёнки в группе «Им2+рIL-1β» наблюдалась статистически недостоверная тенденция к ограничению беталейкин- зависимой гипоплазии селезёнки. Но при этом в группе «Им2+рIL-1β» отмечено повышение количества спленоцитов с внутриядрышковыми депозитами Ag.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что чувствительность лейкоцитарного звена системы крови к действию рIL-1β меняется в противоположных направлениях при стрессорных воздействиях с альтернативными вариантами адаптационной стратегии. Но в тоже время между группами Им1 и Им2 прослеживаются и однотипные изменения в ответ на дополнительное введение рIL-1β. Прежде всего это касается защитного действия по отношению рIL-1β-зависимой гипоплазии иммунных органов. Как уже ранее упоминалось в данном случае снижение количества кариоцитов в тимусе и в селезёнке, обусловлено цитокин-зависимой активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Между тем как для ежедневных, так и для редко чередующихся иммобилизаций характерно повышенная устойчивость иммунных органов к гипоплазирующему действию глюкокортикоидов (Цейликман В.Э. и соавт., 1995; Волчегорский И.А. и соавт., 2005). Причём для Им1 этот эффект больше выражен в отношении селезёнки, а для Им2 в отношении тимуса, что хорошо согласуется с нашими исследованиями.

Таким образом, несмотря на стереотипные изменения чувствительности к глюкокортикоидам и содержания гормонов в крови, а также реакции лейкоцитарного звена системы крови на повторные иммобилизации, иммуностропные эффекты исследованных режимов хронического стресса были диаметрально противоположны. Полученные нами результаты позволяют связать подобные тенденции с различным характером чувствительности к провоспалительным цитокинам. Справедливость этого положения

доказана в отношении rIL-1 $\beta$ . В дальнейших исследованиях необходимо подтвердить справедливость этой гипотезы применительно к другим провоспалительным цитокинам.

#### **Выводы:**

1. При доминировании толерантной стратегии повышенная чувствительность к иммунизации проявлялась в усилении клеточного звена иммунитета. При доминировании резистентной стратегии сниженная чувствительность к иммунизации аллоантигенам проявлялась в угнетении клеточного звена иммунитета.
2. Повышенная чувствительность к рекомбинантному IL-1 $\beta$  проявлялась в усугублении лейкоцитоза, развитие которого обусловлено приростом содержания палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов
3. Сниженная чувствительность к рекомбинантному IL-1 $\beta$  проявлялась в уменьшении выраженности стрессорного нейтрофилёза, за счёт ограничения мобилизации костно мозговых нейтрофилов
4. Характерная для ежедневных иммобилизаций гипоплазия лимфоидных органов и костного мозга связана с индукцией апоптоза и угнетением пролиферации.
5. Характерная для редко чередующихся иммобилизаций гипоплазия лимфоидных органов и костного мозга связана с усилением поступления лейкоцитарных клеток в циркуляцию
6. Ежедневные и редкочередующиеся стрессорные воздействия вызывают однонаправленные изменения в лейкоцитарной формуле крови и ограничивают, вызванную рекомбинантным IL-1 гипоплазию лимфоидной ткани.
7. Гипоплазия иммунных органов, вызванная рекомбинантным IL-1 и повторными стрессорными воздействиями, ассоциирована со снижением содержания кариоцитов, для которых характерно одновременное присутствие экстрануклеолярных и интрануклеолярных депозитов Ag.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Григорьев И.И. Дополнительное введение рекомбинантного IL-1 $\beta$  усугубляет стрессорный лейкоцитоз: материалы IV конф. иммунологов Урала / О.Б. Цейликман., С.В. Сибиряк, В.Э. Цейликман, И.И. Григорьев, А.С. Симбирцев // Иммунология Урала. - 2005. - N1(4). - С.30.
2. Григорьев И.И. Влияние повторных иммобилизаций на выраженность апаптоза и оксидативного стресса в тимусе крыс: материалы III конференции иммунологов Урала / Цейликман О. Б., Цейликман В. Э., Сибиряк С. В., Бубнов Н. В., Синицкий А. И., Сибиряк Д. С., Сысаков Д. А., Григорьев И. И., Козочкин Д. А. //Иммунология Урала. – 2003. - №1(3). – С.72.

3. Григорьев И.И. Усиление повторными стрессорными воздействиями цитокин-зависимой супрессии монооксигеназ и оксидативного стресса в печени: материалы III итоговой научно-практической конференции молодых учёных Челябинской государственной медицинской академии. / Горностаева А. Б., Цейликман О. Б., Сысаков Д. А., Лаптева И. А., Бубнов Н. В., Сеницкий А. И., Козочкин Д. А., Тимофеева Т. Г., Григорьев И. И. // Челябинск 2005. – С. 41.
4. Григорьев И.И. Адаптивные и дезадаптивные последствия резистентной и толерантной биохимических стратегий адаптации: материалы научно-практической конференции с международным участием. / Цейликман В. Э., Цейликман О. Б., Сеницкий А. И., Романов Д. А., Лавин Е. А., Григорьев И. И., Добина М. Е., Лаптева И. А., Горностаева А. Б., Филимонова Т. А., // Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины. – Астрахань – Волгоград – Москва 2006. – С.25.
5. Григорьев И.И. Влияние гипокинетического стресса на глюкокортикоид-зависимые изменения состояния ядрышкового организатора в тимусе у крыс. И. И. Григорьев, В. Э. Цейликман, О. Б. Цейликман, Д. З. Шибкова. Д. А. Учаев. Д. А. Козочкин. Т. А. Филимонова. Материалы Всероссийской научной конференции: АДАПТАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ К ЕСТЕСТВЕННЫМ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ. Челябинск 2004г.
6. Григорьев И.И. Особенности иммуотропных эффектов хронического стресса у нормотензивных и гипертензивных крыс. / Цейликман В. Э., Козочкин Д. А., Маркель А. Л., Григорьев И. И., Цейликман О. Б., Сеницкий А. И., Бубнов Н. В., Лавин Е. А. / Официальный журнал Санкт-Петербургского Регионального Отделения Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов – Медицинская Иммунология – Том 8, №2-3 С. 109-478. С.187.
7. Grigoriev I.I. Immune and monooxygenase system interaction under the stress conditions /Tseilikman O., Tseilikman V., Sisakov D., Sinitskii A.,Bubnov N., Grigoriev I., Lavin E., Dobina M 16 European Congress of Immunology. -2006- Paris-P.443
8. Григорьев И.И. О механизмах развития гипоплазии лимфоидных органов при ежедневных иммобилизациях. /Шибкова Д.З., Цейликман О.Б., Григорьев И.И.// Вестник Челябинского государственного педагогического университета.-2006-№5- С.257-264

### **Список сокращений**

АОК- антителообразующие клетки

ГЗТ- реакция гиперчувствительности замедленного типа

Им1- иммобилизации ежедневные

Им2-иммобилизации редко чередующиеся

pIL-1- $\beta$ -рекомбинантный интерлейкин 1 бета

ЯСК- ядро содержащие клетки

Ag-NORS – Ag-nuclear organizer regions associated proteins – аргерофильные белки  
ассоциированные с зонами ядрышковых организаторов