

МИНАЕВА
ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ
УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Нервная, эндокринная, а также иммунная системы выполняют совместную функцию сохранения динамического гомеостаза в организме. В выполнении этой функции указанные системы объединяются в общую иммунно-нейроэндокринную систему, в которой они взаимодействуют по принципу взаимной регуляции, осуществляемой нейромедиаторами, нейропептидами, трофическими факторами, гормонами, лимфокинами через соответствующий рецепторный аппарат (Б.Г.Юшков, 1999; Р.М.Хаитов, 2001, 2006; В.А.Черешнев, 2002).

В настоящее время накоплен значительный клинический и экспериментальный материал о нарушении иммунологического статуса организма при разных формах иммунопатологии, однако отсутствуют четкие представления о значении иммунной системы в адаптивном синдроме при стрессе, а также при стресс-лимитирующих воздействиях.

Иммунная система, являясь одной из важнейших регуляторных систем в организме, сохраняет гомеостаз посредством выделения, накопления и связывания биологически активных веществ, и принимает непосредственное участие в механизмах стресса и адаптационного синдрома (М.З.Федорова, В.Н.Левин, В.Д.Торичева, 2000; В.Т.Шаляпина и др., 2001).

Наиболее доступным и информативным способом контроля иммунной системы является регистрация изменений клеточного состава крови. В ответ на действие стрессорного фактора в организме запускаются различные механизмы иммунной защиты. Первый уровень иммунной защиты носит неспецифический характер, а второй – специфический, они находятся в постоянном взаимодействии друг с другом (И.Г.Акмаев, 2003; О.Е.Погуляева, 2005).

В процессе жизнедеятельности человек постоянно подвергается действию эмоциональных, физических, психологических нагрузок, вызывающих стресс. Современные, большей частью стрессовые, условия жизнедеятельности человека представляют собой один из аспектов применения большого класса регуляторных пептидов. Механизмы действия этих препаратов, в том числе их влияние на иммунную систему, изучены недостаточно. Поэтому представляет интерес исследовать влияние феназепама и даларгина на неспецифическое звено иммунной системы в условиях стресса.

Цель исследования: Изучить неспецифическую иммунологическую резистентность у крыс с различной прогностической устойчивостью к стрессорным воздействиям

Задачи исследования:

1. Изучить изменение неспецифического звена иммунного ответа у крыс при иммобилизационном стрессе различной длительности.

2. Выяснить роль адренергических и ангиотензинергических механизмов мозга в реализации неспецифического звена иммунного ответа у крыс при нейрогенном стрессе.
3. Изучить неспецифическое звено иммунного ответа у крыс с различной прогностической устойчивостью к стрессу.
4. Оценить неспецифическое звено иммунного ответа у крыс при внутрибрюшинном введении стресс-лимитирующих веществ даларгина и феназепам.

Научная новизна полученных результатов

- Впервые показано, что неспецифическое звено иммунного ответа зависит от индивидуальной стресс-устойчивости животных;
- Впервые выявлено, что при нейрогенном стрессе в формировании неспецифического звена иммунного ответа принимают участие адренергические и ангиотензинергические структуры мозга;
- Показано, что неспецифическое звено иммунного ответа зависит от вида и продолжительности стрессорного воздействия;
- Установлено стресс-протекторное влияние опиоидных пептидов в механизмах формирования неспецифического звена иммунного ответа.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

В работе проведен анализ изменений неспецифического звена иммунного ответа в условиях активации и подавления нейрогенного стресса у экспериментальных животных.

Выявлено, что центральные адрен- и ангиотензинергические механизмы вовлечены в реализацию влияния хронического эмоционального стресса на иммунный ответ.

Показано, что ответ иммунного звена зависит от индивидуальной стресс-устойчивости животных.

Установлено стресс-лимитирующее влияние опиоидных пептидов в механизмах формирования неспецифического звена иммунного ответа.

Полученные данные позволяют глубже понять патогенетические механизмы, лежащие в основе развития иммунного ответа при различных состояниях эмоционального перенапряжения, а также могут стать теоретической основой для разработки профилактических мер, ослабляющих негативное действие эмоционального стресса на иммунный ответ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стресс-реализующее влияние нейрогенного стресса различного генеза на неспецифическое звено иммунного ответа осуществляется с участием адрен- и ангиотензинреактивных механизмов.
2. Стресс-лимитирующий эффект даларгина и феназепам на неспецифическое звено иммунного ответа зависит от прогностической устойчивости животных к стрессу

Апробация работы

Результаты исследований представлены или доложены на: XVIII съезде физиологического общества России (Казань, 25-28 сентября 2001 г.); IV съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002); Международном симпозиуме «Динамичекая электронейростимулирующая терапия. Новые рубежи и итоги эмпирического этапа развития» (Екатеринбург, 2003); XII Всероссийской конференции «Нейроиммунология» (2003); VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 25-27 июня 2008); VII Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 160-летию со дня рождения И.П.Павлова «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009); XXI Всероссийский съезд физиологического общества им. И.П.Павлова (20-25 сентября 2010 г., Калуга); межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной физиологии и медицины» (Ижевск, 27-28 октября 2010); III Съезде физиологов СНГ (Ялта, 2011).

Сведения о публикациях. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 6 работ – в ведущих научных рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с изложением результатов собственных исследований и их обсуждением, заключения, выводов и списка использованных источников, который содержит 210 работ, из них 148 отечественных и 62 иностранных авторов. Текст иллюстрирован 10 таблицами и 7 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Опыты проведены на 129 половозрелых крысах-самцах со средним весом 200-300 г. Исследования осуществлялись в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267).

Острый стресс моделировали однократной жёсткой 8-х часовой фиксацией экспериментальных животных на спине.

Хронический иммобилизационный стресс у крыс вызывали путем помещения их в тесные «пеналы» по 8 часов в сутки в течение 10 и 20 дней.

Нейрогенный стресс моделировали путем введения физиологически активных веществ (адреналина гидрохлорид (20 мкг) и ангиотензин-II (150 нг), растворенных в 5 мкл изотонического раствора NaCl) через имплантированные канюли по стереотаксическим координатам (Л.Буреш и др., 1991) в боковой желудочек мозга (AP=-1; V=1,5; S=2,7) через день с

помощью микроинъектора-хемитрода в течение 10 дней. Контроль локализации канюль осуществляли гистологически.

Для выяснения взаимного (или потенцирующего или угнетающего) влияния на неспецифическое звено иммунного ответа стресс-лимитирующих веществ были проведены серии опытов при сочетании иммобилизационного стресса с ежедневным внутрибрюшинным введением феназепама (0,14 мг/кг) и даларгина (0,1 мг/кг) в течение 10 и 20 дней.

Состояние неспецифического звена иммунного ответа изучали по следующим показателям: Le. по методу Николаева, лейкоцитарной формуле (Э, Б, Н, Л, М), фагоцитарной активности (ФИ и ФЧ) и бактерицидной активности (НСТ⁺баз., ИАН баз., НСТ⁺стим., ИАН стим.) по методике Х.Фримель, Й.Брок (1986).

В некоторых сериях опытов перед началом экспериментов оценивали поведенческую активность животных в тесте открытого поля (Е.В.Коплик, 1995).

В некоторых сериях опытов для подтверждения развития стрессорной реакции у экспериментальных животных определяли флюориметрическим методом 11-ОКС.

По результатам тестирования выявили 2 группы: к первой группе относили активных животных, которых расценивали как прогностически устойчивых к стрессу, и ко второй – пассивных животных – прогностически неустойчивых к стрессу.

Статистический анализ полученных результатов проводили по декадам. В качестве контроля служили интактные животные, не получавшие раздражения, а также животные с внутрижелудочковым и внутрибрюшинным введением физиологического раствора в тех же объемах, что и исследуемые вещества.

Статистическая достоверность данных установлена для независимых выборок на основании U-критерия Манна-Уитни. Уровень достоверности оценивался при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Неспецифическое звено иммунного ответа при стрессорных воздействиях различного генеза

При однократной восьмичасовой иммобилизации в клетках-пеналах отмечали (табл. 1) повышение общего количества лейкоцитов на 39,6% ($P < 0,01$), нейтрофилов на 43,9% ($P < 0,05$), снижение содержания базофилов с $1,30 \pm 0,42$ до $0,20 \pm 0,04\%$ ($P < 0,05$), лимфоцитов с $69,30 \pm 1,67$ до $62,80 \pm 1,75\%$ ($P < 0,05$), бактерицидной активности: НСТ⁺баз – с $8,20 \pm 0,47$ до $6,66 \pm 0,23$ ($P < 0,05$), ИАН баз. – с $0,13 \pm 0,01$ до $0,095 \pm 0,001$ ($P < 0,05$), НСТ⁺стим. – с $69,00 \pm 2,57$ до $41,40 \pm 2,36\%$ ($P < 0,001$) и ИАН стим. – с $1,14 \pm 0,13$ до $0,72 \pm 0,14$

($P < 0,05$). Достоверного изменения процентного содержания моноцитов и фагоцитарной активности не выявлено.

Хронический иммобилизационный стресс (таб. 1) приводил к снижению на 10-й день опытов общего количества лейкоцитов с $9,14 \pm 0,38$ до $4,96 \pm 0,70 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,001$) и оставался пониженным до 20-го дня (до $7,98 \pm 0,31 \cdot 10^9/\text{л}$, $P < 0,05$). Особенностью хронического иммобилизационного стресса явилось фазное изменение количества нейтрофилов, которые повышались на 10-й день на 66,7% ($P < 0,05$) и возвращались к исходному уровню на 20-й день эксперимента. Содержание базофилов и лимфоцитов снижалось к 10-му дню соответственно с $1,30 \pm 0,42$ до $0,30 \pm 0,10\%$ ($P < 0,05$) и с $69,30 \pm 1,67$ до $59,40 \pm 2,27\%$ ($P < 0,01$). Снижение количества моноцитов и фагоцитарной активности наблюдалось к 10-му дню и продолжалось до 20-го дня с $5,00 \pm 0,37$ до $2,20 \pm 0,45$ и $1,70 \pm 0,68\%$ ($P < 0,001$) и с $79,20 \pm 3,72$ до $63,60 \pm 3,69\%$ ($P < 0,05$) и $52,00 \pm 3,07\%$ ($P < 0,001$) соответственно. Бактерицидная активность в стимулированных условиях снижалась к 10-му дню воздействий: НСТ⁺стим. – с $69,00 \pm 2,57$ до $51,80 \pm 4,37\%$ ($P < 0,01$) и ИАН стим. – с $1,14 \pm 0,13$ до $0,79 \pm 0,08$ ($P < 0,05$) с), но возвращалась к норме в конце эксперимента.

Таблица 1.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа при различных видах иммобилизационного стресса

Показатель	Контроль	Острый стресс	Стресс 10 дней	Стресс 20 дней
Le, $\cdot 10^9/\text{л}$	$9,14 \pm 0,38$	$12,76 \pm 0,97^{**}$	$4,96 \pm 0,70^{***}$	$7,98 \pm 0,31^*$
Э, %	$2,00 \pm 0,37$	$1,20 \pm 0,4$	$1,20 \pm 0,37$	$1,20 \pm 0,70$
Б, %	$1,30 \pm 0,42$	$0,20 \pm 0,04^*$	$0,30 \pm 0,10^*$	$0,24 \pm 0,80$
Н, %	$22,80 \pm 2,77$	$32,80 \pm 2,80^*$	$38,00 \pm 6,16^*$	$28,40 \pm 4,77$
Л, %	$69,30 \pm 1,67$	$62,80 \pm 1,75^*$	$59,40 \pm 2,27^{**}$	$66,90 \pm 4,41$
М, %	$5,00 \pm 0,37$	$4,00 \pm 0,45$	$2,20 \pm 0,45^{***}$	$1,70 \pm 0,68^{***}$
ФИ, %	$79,20 \pm 3,72$	$77,40 \pm 3,90$	$63,60 \pm 3,69^*$	$52,00 \pm 3,07^{***}$
ФЧ	$2,44 \pm 0,27$	$1,76 \pm 0,15^*$	$2,10 \pm 0,22$	$2,00 \pm 0,31$
НСТ баз, %	$8,2 \pm 0,47$	$6,66 \pm 0,23^*$	$12,40 \pm 1,07^{**}$	$8,20 \pm 0,25$
ИАН баз.	$0,126 \pm 0,011$	$0,095 \pm 0,001^*$	$0,159 \pm 0,003^*$	$0,09 \pm 0,02$
НСТ стим., %	$69,00 \pm 2,57$	$41,40 \pm 2,36^{***}$	$51,80 \pm 4,37^{**}$	$58,20 \pm 4,60$
ИАН стим.	$1,14 \pm 0,13$	$0,72 \pm 0,14^*$	$0,79 \pm 0,08^*$	$0,96 \pm 0,17$

Примечание: * – достоверные отличия показателей по сравнению с контролем.

Интрацестернальное введение ангиотензина-II (табл. 2) приводило к снижению количества лейкоцитов с $9,27 \pm 0,98$ до $4,18 \pm 0,49 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,001$), эозинофилов с $1,83 \pm 0,26$ до $1,03 \pm 0,08\%$ ($P < 0,05$), базофилов с $1,16 \pm 0,02$ до $0,33 \pm 0,04\%$ ($P < 0,001$), лимфоцитов с $64,66 \pm 1,08$ до $57,83 \pm 1,85\%$ ($P < 0,01$), моноцитов с $2,16 \pm 0,07$ до $1,17 \pm 0,08\%$ ($P < 0,001$), фагоцитарной активности: ФИ – с $66,80 \pm 1,26$ до $54,67 \pm 2,50\%$ ($P < 0,01$), ФЧ – с $2,20 \pm 0,07$ до $1,15 \pm 0,27$ ($P < 0,01$); бактерицидной активности: НСТ⁺баз – с $7,66 \pm 0,54$ до $5,17 \pm 0,69$ ($P < 0,05$), ИАН баз. – с $0,11 \pm 0,001$ до $0,06 \pm 0,007$ ($P < 0,001$), НСТ⁺стим. – с $71,50 \pm 4,99$ до $43,00 \pm 2,08\%$ ($P < 0,001$) и ИАН стим. – с $0,91 \pm 0,13$ до $0,44 \pm 0,01$ ($P < 0,01$). Содержание нейтрофилов повышалось с $27,57 \pm 1,50$ до $33,71 \pm 1,55$ ($P < 0,05$).

Интравентрикулярное введение адреналина (таб. 2) сопровождалось снижением количества лейкоцитов с $9,27 \pm 0,98$ до $5,30 \pm 0,32 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,01$), эозинофилов с $1,83 \pm 0,26$ до $1,10 \pm 0,06\%$ ($P < 0,05$), базофилов с $1,16 \pm 0,02$ до $0,76 \pm 0,03\%$ ($P < 0,001$), лимфоцитов с $64,66 \pm 1,08$ до $58,17 \pm 2,34\%$ ($P < 0,05$), моноцитов с $2,16 \pm 0,07$ до $1,83 \pm 0,03\%$ ($P < 0,01$), фагоцитарной активности: ФИ – с $66,80 \pm 1,26$ до $59,04 \pm 2,16\%$ ($P < 0,05$), ФЧ – с $2,20 \pm 0,07$ до $1,25 \pm 0,18$ ($P < 0,001$); бактерицидной активности: НСТ⁺баз – с $7,66 \pm 0,54$ до $5,33 \pm 0,74$ ($P < 0,05$), ИАН баз. – с $0,11 \pm 0,001$ до $0,08 \pm 0,01$ ($P < 0,05$), НСТ⁺стим. – с $71,50 \pm 4,99$ до $57,00 \pm 4,02\%$ ($P < 0,05$) и ИАН стим. – с $0,91 \pm 0,13$ до $0,54 \pm 0,09$ ($P < 0,05$). Содержание нейтрофилов повышалось с $27,57 \pm 1,50$ до $35,14 \pm 1,36\%$ ($P < 0,01$).

Таблица 2.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа при внутрижелудочковом введении ангиотензина-II и адреналина

Показатель	Контроль	Ангиотензин-II	Адреналин
Le, $\cdot 10^9/\text{л}$	$9,27 \pm 0,98$	$4,18 \pm 0,49^{***}$	$5,30 \pm 0,32^{**}$
Э, %	$1,83 \pm 0,26$	$1,03 \pm 0,08^*$	$1,10 \pm 0,06^*$
Б, %	$1,16 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,04^{***}$	$0,76 \pm 0,03^{***}$
Н, %	$27,57 \pm 1,50$	$33,71 \pm 1,55^*$	$35,14 \pm 1,36^{**}$
Л, %	$64,66 \pm 1,08$	$57,83 \pm 1,85^{**}$	$58,17 \pm 2,34^*$
М, %	$2,16 \pm 0,07$	$1,17 \pm 0,08^{***}$	$1,83 \pm 0,03^{**}$
ФИ, %	$66,80 \pm 1,26$	$54,67 \pm 2,5^{**}$	$59,04 \pm 2,16^*$
ФЧ	$2,20 \pm 0,07$	$1,15 \pm 0,27^{**}$	$1,25 \pm 0,18^{***}$
НСТ ⁺ баз., %	$7,66 \pm 0,54$	$5,17 \pm 0,69^*$	$5,33 \pm 0,74^*$
ИАН баз.	$0,11 \pm 0,001$	$0,06 \pm 0,007^{***}$	$0,08 \pm 0,01^*$
НСТ ⁺ стим., %	$71,50 \pm 4,99$	$43,00 \pm 2,08^{***}$	$57,00 \pm 4,02^*$
ИАН стим.	$0,91 \pm 0,13$	$0,44 \pm 0,01^{**}$	$0,54 \pm 0,09^*$

Примечание: * – достоверные отличия показателей по сравнению с контролем

2. Неспецифическое звено иммунного ответа у крыс с различной прогностической устойчивостью к эмоциональному стрессу

В этой серии опытов перед началом экспериментов оценивали прогностическую устойчивость животных к стрессу методом «открытого поля». Животных делили на две группы, используя следующие параметры: латентный период первого перемещения, латентный период выхода в центр, горизонтальные амбуляции, исследовательская и вертикальная активность, время груминга и показатель вегетативного баланса.

Несмотря на то, что животные были разделены по стресс-устойчивости на две группы, в показателях белой крови, а также в показателях бактерицидной и фагоцитарной активности различий не наблюдалось.

Таблица 3.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа у стресс-устойчивых животных при хроническом иммобилизационном стрессе

Показатель	Контроль	Стресс 10 дней	Стресс 20 дней
Le, $\cdot 10^9$ /л	9,18±0,38	7,98±0,31*	4,96±0,70***
Э, %	2,00±0,50	1,00±0,50	0,50±0,20*
Б, %	2,00±0,50	1,00±0,50	2,00±0,50
Н, %	21,80±2,15	38,00±3,16**	28,49±1,37*
Л, %	71,60±2,08	58,40±2,27**	66,90±2,21
М, %	3,40±0,52	2,20±0,45	1,70±0,48*
ФИ, %	64,04±3,36	63,60±3,69	52,00±3,07*
ФЧ	2,44±0,19	2,10±0,22	2,00±0,31
НСТ ⁺ баз, %	8,20±0,69	12,40±2,07	8,20±2,25
ИАН баз.	0,09±0,003	0,15±0,03	0,09±0,018
НСТ ⁺ стим., %	60,34±2,86	58,20±1,60	51,80±1,37*
ИАН стим.	1,18±0,11	0,99±0,12	0,96±0,17

Примечание: * – достоверные отличия показателей по сравнению с контролем.

Таблица 4.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа у стресс-неустойчивых животных при хроническом иммобилизационном стрессе

Показатель	Контроль	Стресс 10 дней	Стресс 20 дней
Le, $\cdot 10^9$ /л	8,82±0,25	6,62±0,68*	3,66±0,91***
Э, %	2,00±0,50	0,0***	0,0***
Б, %	0,0	0,0	0,0
Н, %	26,40±2,50	45,60±3,39***	34,57±2,56*
Л, %	68,60±3,08	52,40±3,58**	63,57±5,03
М, %	3,00±0,63	2,00±0,71	1,86±0,38
ФИ, %	60,48±1,26	50,20±3,49*	41,00±3,56***
ФЧ	1,98±0,07	1,82±0,51	1,69±0,24
НСТ баз., %	8,11±0,54	9,00±1,58	6,00±0,79*
ИАН баз.	0,14±0,01	0,09±0,02*	0,08±0,02**
НСТ стим., %	66,98±3,16	52,80±3,22*	47,14±2,45***
ИАН стим.	0,91±0,13	0,78±0,14	0,69±0,17

Примечание: * – достоверные отличия показателей по сравнению с контролем

При хроническом иммобилизационном стрессе у стресс-устойчивых животных (таб. 3) общее количество лейкоцитов постепенно снижалось на всем протяжении эксперимента, начиная с 10-го дня с 9,18±0,38 до 7,98±0,31 ($P < 0,05$) и до 4,96±0,70 $\cdot 10^9$ /л, $P < 0,001$. У стресс-неустойчивых животных (таб. 4) эти изменения имели ту же динамику, но были более выражены – с 8,82±0,25 до 6,62±0,68 ($P < 0,05$) и до 3,66±0,91 $\cdot 10^9$ /л ($P < 0,001$).

Изменения в лейкоцитарной формуле у стресс-устойчивых и стресс-неустойчивых животных в целом носили однонаправленный характер, хотя и наблюдались некоторые отличия. Так, содержание нейтрофилов увеличивается к 10-му дню с 21,80±2,15 до 38,00±3,16% ($P < 0,01$) у стресс-

устойчивых и с $26,40 \pm 2,50$ до $45,60 \pm 3,39\%$ ($P < 0,001$) у стресс-неустойчивых животных и оставалось повышенным до конца эксперимента (до $28,49 \pm 1,37$ и $34,57 \pm 2,56$, $P < 0,05$ соответственно). Процентное содержание лимфоцитов в обеих группах снижалось к 10-му дню с $71,60 \pm 2,08$ до $58,40 \pm 2,27\%$ ($P < 0,01$) у стресс-устойчивых и с $68,60 \pm 3,08$ до $52,40 \pm 3,58\%$ ($P < 0,01$) у стресс-неустойчивых животных, возвращаясь к норме на 20-й день эксперимента.

Содержание эозинофилов у стресс-устойчивых животных снижалось только к 20-му дню эксперимента с $2,00 \pm 0,50$ до $0,50 \pm 0,20\%$ ($P < 0,05$), а у стресс-неустойчивых уже к 10-му дню наблюдалась анэозинофилия, процентное содержание базофилов в обеих группах достоверно не изменялось, а количество моноцитов имело тенденцию к снижению в течение всего периода эксперимента.

Фагоцитарная активность у стресс-устойчивых животных снижалась только на 20-й день экспериментов (ФИ – с $64,04 \pm 3,36$ до $52,00 \pm 3,07\%$, $P < 0,05$; ФЧ – с $2,44 \pm 0,19$ до $2,00 \pm 0,31$, $P > 0,05$), а у стресс-неустойчивых животных фагоцитарная активность была снижена уже к 10-му дню (ФИ – с $60,48 \pm 1,26$ до $50,20 \pm 3,49$, $P < 0,05$; ФЧ – с $1,98 \pm 0,07$ до $1,82 \pm 0,51$, $P > 0,05$) и продолжала снижаться до конца исследований (ФИ до $41,00 \pm 3,56\%$, $P < 0,001$ и ФЧ до $1,69 \pm 0,24$, $P > 0,05$).

Бактерицидная в стимулированных условиях как и фагоцитарная активность постепенно снижалась у стресс-устойчивых животных достигая к 20-му дню воздействий НСТ⁺стим. – $51,80 \pm 1,37\%$ ($P < 0,05$), ИАН стим. – $0,96 \pm 0,17$ ($P > 0,05$) а у стресс-неустойчивых животных бактерицидная активность снижалась как в базовых, так и стимулированных условиях уже к 10-му дню: НСТ баз. – с $8,11 \pm 0,54$ до $6,00 \pm 0,79$ ($P > 0,05$), ИАН баз. – с $0,14 \pm 0,01$ до $0,08 \pm 0,02$ ($P < 0,01$), НСТ⁺стим. – с $66,98 \pm 3,16$ до $52,80 \pm 3,22\%$ ($P < 0,05$), ИАН стим. – с $0,91 \pm 0,13$ до $0,78 \pm 0,14$ ($P > 0,05$), продолжая уменьшаться $47,14 \pm 2,45$ ($P < 0,001$) и до $0,69 \pm 0,17$ ($P > 0,05$) соответственно к концу экспериментов.

Масса тимуса у стресс-устойчивых животных снизилась на 18,9%, а у стресс-неустойчивых животных – на 67,7% к концу исследований.

Содержание 11-ОКС увеличилось на 162,9% и 249,6% у стресс-устойчивых и стресс-неустойчивых животных соответственно в период данной серии эксперимента.

3. Неспецифическое звено иммунного ответа при введении стресс-лимитирующих веществ (даларгин, феназепам)

Внутрибрюшинное введение даларгина на фоне иммобилизационного стресса приводило к восстановлению показателей неспецифического звена иммунного ответа как у стресс-устойчивых, так и стресс-неустойчивых животных (табл. 5, 6). Общее количество лейкоцитов нормализуется как у стресс-устойчивых животных с $4,96 \pm 0,70$ до $8,20 \pm 0,20 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,001$), так и у стресс-неустойчивых с $3,66 \pm 0,91$ до $8,07 \pm 0,57 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,001$) к 20-му дню опытов.

Таблица 5.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа при внутрибрюшинном введении даларгина на фоне иммобилизационного стресса у стресс-устойчивых животных

Показатель	Контроль	Стресс 10 дней	Стресс 10 дней + даларгин	Стресс 20 дней	Стресс 20 дней + даларгин
Le, $\bullet 10^9$ /л	9,18 \pm 0,38	7,98 \pm 0,31*	8,70 \pm 0,40	4,96 \pm 0,70***	8,20 \pm 0,25\\\
Э, %	2,00 \pm 0,50	1,00 \pm 0,50	1,00 \pm 0,50	0,50 \pm 0,20*	1,00 \pm 0,50
Б, %	2,00 \pm 0,50	1,00 \pm 0,50	1,00 \pm 0,50	2,00 \pm 0,50	1,00 \pm 0,50
Н, %	21,8 \pm 2,15	38,00 \pm 3,16**	26,50 \pm 2,12\	28,49 \pm 1,37*	26,50 \pm 2,50
Л, %	71,6 \pm 2,08	58,40 \pm 2,27**	70,50 \pm 3,50\	66,90 \pm 2,21	68,91 \pm 2,41
М, %	3,40 \pm 0,52	2,20 \pm 0,45	3,00 \pm 1,40	1,70 \pm 0,48*	2,50 \pm 0,70
ФИ, %	64,04 \pm 3,36	63,60 \pm 3,69	63,75 \pm 3,46	52,00 \pm 3,07*	62,04 \pm 2,27\
ФЧ	2,44 \pm 0,19	2,10 \pm 0,22	1,60 \pm 0,40	2,00 \pm 0,31	2,30 \pm 0,14
НСТ баз, %	8,20 \pm 0,69	12,40 \pm 2,07	9,50 \pm 0,54	8,20 \pm 2,25	8,30 \pm 1,06
ИАН баз.	0,09 \pm 0,003	0,15 \pm 0,03	0,12 \pm 0,07	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01
НСТ стим., %	60,34 \pm 2,86	58,20 \pm 1,60	60,26 \pm 2,12	51,80 \pm 1,37*	57,50 \pm 0,71\\\
ИАН стим.	1,18 \pm 0,11	0,99 \pm 0,12	1,14 \pm 0,01	0,96 \pm 0,17	1,13 \pm 0,01

Примечание: * – достоверность по сравнению с контролем;
 \ – достоверность по сравнению со стрессом

Таблица 6.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа при внутрибрюшинном введении даларгина на фоне иммобилизационного стресса у стресс-неустойчивых животных

Показатель	Контроль	Стресс 10 дней	Стресс 10 дней + даларгин	Стресс 20 дней	Стресс 20 дней + даларгин
Le, $\bullet 10^9$ /л	8,82 \pm 0,25	6,62 \pm 0,68*	8,70 \pm 0,90	3,66 \pm 0,91***	8,07 \pm 0,57\\\
Э, %	2,00 \pm 0,50	0,0***	1,00 \pm 0,50	0,0***	1,00 \pm 0,50
Б, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Н, %	26,40 \pm 2,50	45,60 \pm 3,39***	31,00 \pm 1,41\\\	34,57 \pm 2,56*	28,00 \pm 2,49
Л, %	68,60 \pm 3,08	52,40 \pm 3,58**	63,58 \pm 2,20\	63,57 \pm 5,03	59,30 \pm 3,07
М, %	3,00 \pm 0,63	2,00 \pm 0,71	3,00 \pm 0,70	1,86 \pm 0,38	2,70 \pm 0,60
ФИ, %	60,48 \pm 1,26	50,20 \pm 3,49*	57,50 \pm 1,95	41,00 \pm 3,56***	58,70 \pm 1,50\\\
ФЧ	1,98 \pm 0,07	1,82 \pm 0,51	1,88 \pm 0,10	1,69 \pm 0,24	1,85 \pm 0,27
НСТ баз, %	8,11 \pm 0,54	9,00 \pm 1,58	8,50 \pm 1,43	6,00 \pm 0,79*	8,07 \pm 0,23
ИАН баз.	0,14 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02*	0,13 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02*	0,12 \pm 0,02
НСТ стим., %	66,98 \pm 3,16	52,80 \pm 3,22*	61,50 \pm 3,50	47,14 \pm 2,45***	63,30 \pm 3,06\\\
ИАН стим.	0,91 \pm 0,13	0,78 \pm 0,14	0,85 \pm 0,07	0,69 \pm 0,17	0,82 \pm 0,02

Примечание: * – достоверность по сравнению с контролем;
 \ – достоверность по сравнению со стрессом

Процентное содержание эозинофилов у стресс-устойчивых животных практически не менялось, тогда как у стресс-неустойчивых – при стрессе эозинофилы не определялись и выявлялись при сочетанных воздействиях.

При внутрибрюшинном введении даларгина на фоне иммобилизационного стресса содержание нейтрофилов приближалось к контрольным данным уже к 10-му дню эксперимента как у стресс-устойчивых, так и у стресс-неустойчивых животных до $26,50 \pm 2,12\%$ ($P < 0,05$) и до $31,00 \pm 1,41\%$ ($P < 0,01$) соответственно.

Процентное содержание базофилов в обеих группах исследований не претерпевало достоверных изменений по сравнению с контрольной группой.

Количество лимфоцитов приходило к норме уже к 10-му дню как у стресс-устойчивых, так и у стресс-неустойчивых животных с $58,40 \pm 2,27$ до $70,50 \pm 3,50\%$ ($P < 0,05$) и с $52,40 \pm 3,58$ до $63,58 \pm 2,20\%$ ($P < 0,05$) соответственно.

При введении даларгина наблюдалось снижение процентного содержания моноцитов только у стресс-устойчивых животных к концу эксперимента.

В наших исследованиях как бактерицидная, так и фагоцитарная активность при различных видах стрессорных воздействий была резко снижена, а введение даларгина нивелировало действие стресса в обеих группах исследуемых животных.

Общее количество лейкоцитов при внутрибрюшинном введении феназепама у стресс-устойчивых животных (таб. 9) восстанавливалось к концу эксперимента с $4,96 \pm 0,70$ до $8,20 \pm 0,28 \cdot 10^9/\text{л}$ ($P < 0,01$), тогда как у стресс-неустойчивых животных (таб. 10) восстановление количества лейкоцитов начиналось уже на 10-й день воздействий.

Процентное содержание эозинофилов у стресс-устойчивых животных практически не менялось, тогда как у стресс-неустойчивых – при стрессе эозинофилы не определялись и выявлялись при сочетанных воздействиях.

Процентное содержание базофилов в обеих группах исследований не претерпевало достоверных изменений по сравнению с контрольной группой.

Количество нейтрофилов у стресс-устойчивых животных при введении феназепама на фоне иммобилизационного стресса восстанавливается уже к 10-му дню опытов (до $25,50 \pm 3,09\%$, $P < 0,05$), тогда как у стресс-неустойчивых животных – лишь к 20-му дню (до $27,60 \pm 1,83\%$, $P < 0,05$).

Введение феназепама в течение 20 дней на фоне иммобилизационного стресса приводит процентное содержание агранулоцитов (лимфоцитов и моноцитов) к контрольным значениям как у стресс-устойчивых, так и у стресс-неустойчивых животных.

Введение феназепама на фоне иммобилизационного стресса у стресс-неустойчивых животных на фагоцитарную активность оказывало более выраженное влияние по сравнению с группой стресс-устойчивых животных.

Таблица 7.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа при внутрибрюшинном введении феназепама на фоне иммобилизационного стресса у стресс-устойчивых животных

Показатель	Контроль	Стресс 10 дней	Стресс 10 дней + феназепам	Стресс 20 дней	Стресс 20 дней + феназепам
Le, •10 ⁹ /л	9,18±0,38	7,98±0,31*	8,98±0,91	4,96±0,70***	8,20±0,28\
Э, %	2,00±0,50	1,00±0,50	2,00±0,50	0,50±0,20*	1,00±0,50
Б, %	2,00±0,50	1,00±0,50	2,00±0,50	2,00±0,50	2,00±0,50
Н, %	21,80±2,15	38,00±3,16**	25,50±3,09\	28,49±1,37*	24,50±2,54
Л, %	71,60±2,08	58,40±2,27**	68,82±1,80\	66,90±2,21	68,50±2,54
М, %	3,40±0,52	2,20±0,45	2,90±0,71	1,70±0,48*	2,80±0,01
ФИ, % □ 64,04±3,36 □ 64,04±3,36	63,60±3,69	62,00±3,07	52,00±3,07*	64,00±2,24\	□ ФЧ □ 2,44±0,19 ФЧ
НСТ+баз., %	8,20±0,69	12,40±2,07	9,00±0,66	8,20±2,25	8,25±0,84
ИАН баз.	0,09±0,003	0,15±0,03	0,12±0,03	0,09±0,02	0,09±0,01
НСТ+стим., %	60,34±2,86	58,20±1,60	57,25±1,06	51,80±1,37*	56,87±1,41\
ИАН стим.	1,18±0,11	0,99±0,12	1,02±0,03	0,96±0,17	1,08±0,01

Примечание: * – достоверность по сравнению с контролем;

\ – достоверность по сравнению со стрессом

Таблица 8.

Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа при внутрибрюшинном введении феназепама на фоне иммобилизационного стресса у стресс-неустойчивых животных

Показатель	Контроль	Стресс 10 дней	Стресс 10 дней + феназепам	Стресс 20 дней	Стресс 20 дней + феназепам
Le, •10 ⁹ /л	8,82±0,25	6,62±0,68*	8,43±0,40\	3,66±0,91***	8,40±0,85\
Э, %	2,00±0,50	0,0***	2,00±0,50\	0,0***	2,00±0,50\
Б, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Н, %	26,40±2,50	45,60±3,39***	34,37±1,96*/	34,57±2,56*	27,60±1,83/
Л, %	68,60±3,08	52,40±3,58**	63,67±2,39/	63,57±5,03	67,00±2,24
М, %	3,00±0,63	2,00±0,71	2,67±0,58	1,86±0,38	2,00±0,41
ФИ, %	60,48±1,26	50,20±3,49*	59,33±1,61/	41,00±3,56***	60,32±2,49//
ФЧ	1,98±0,07	1,82±0,51	1,83±0,58	1,69±0,24	1,90±0,71
НСТ+баз., %	8,11±0,54	9,00±1,58	8,27±0,52	6,00±0,79*	8,85±0,45
ИАН баз.	0,14±0,01	0,09±0,02*	0,12±0,04	0,08±0,02*	0,13±0,01
НСТ+стим., %	66,98±3,16	52,80±3,22*	56,50±2,79*	47,14±2,45***	55,50±2,95*
ИАН стим.	0,91±0,13	0,78±0,14	0,83±0,08	0,69±0,17	0,89±0,02

Примечание: * – достоверность по сравнению с контролем;

\ – достоверность по сравнению со стрессом

Бактерицидная активность при введении феназепама на фоне иммобилизационного стресса у стресс-устойчивых животных не изменялась, тогда, как у стресс-неустойчивых животных возвращалась к исходным данным. Вероятно на фоне иммобилизационного стресса внутрибрюшинное введение феназепама у стресс-неустойчивых животных оказывает более выраженный эффект в отношении неспецифического звена иммунного ответа, чем у стресс-устойчивых животных, возможно за счет более высокой лабильности центральных структур стресс-неустойчивых животных, принимающих участие в адаптивных реакциях организма.

Таким образом, в результате наших исследований выявлены существенные различия неспецифического звена иммунного ответа в условиях острого и хронического нейрогенного стресса, при этом, изменения неспецифического звена иммунного ответа как у стресс-устойчивых, так и у стресс-неустойчивых животных носили однонаправленный характер, но степень выраженности этих изменений была более значительной у неустойчивых к стрессу крыс.

Исходя из наших исследований можно говорить о вовлечении одних и тех же центральных адрен-, ангиотензин- и пептидергических механизмов в регуляции неспецифического звена иммунного ответа при стресс-активирующих и стресс-протекторных влияниях, что подтверждается нашими исследованиями при интравентрикулярном введении адреналина и ангиотензина-II, а также синтетического аналога опиоидных пептидов даларгина и изменяющего проведение возбуждения в ЦНС феназепама. По-видимому, иммунологические проявления стресса можно рассматривать как одну из ветвей адаптивной реакции организма.

Выводы

1. При остром иммобилизационном стрессе наблюдается повышение общего количества лейкоцитов, нейтрофилов, снижение количества базофилов, лимфоцитов и показателей бактерицидной активности.
2. При хроническом иммобилизационном стрессе происходит снижение общего количества лейкоцитов, базофилов, лимфоцитов, моноцитов и показателей фагоцитарной активности в течение всего периода эксперимента. Показатели бактерицидной активности изменяются фазно.
3. Показатели неспецифического звена иммунного ответа у крыс при нейрогенном стрессе, инициированном интравентрикулярным введением адреналина и ангиотензина-II, соответствует картине хронического иммобилизационного стресса.
4. Изменение показателей неспецифического звена иммунного ответа у животных с различной стресс-устойчивостью носят однонаправленный характер, но степень выраженности этих изменений более значительна у неустойчивых к стрессу крыс.
5. Внутривентрикулярное введение даларгина на фоне иммобилизационного стресса оказывает модулирующее действие и приводит к восстановлению показателей неспецифического звена иммунного ответа у животных с различной прогностической устойчивостью.
6. Эффект стрессорного воздействия на показатели неспецифического звена иммунного ответа при внутривентрикулярном введении феназепам у экспериментальных животных не проявляется.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние хемореактивных структур Locus Coeruleus на легочный сурфактант и показатели неспецифической иммунологической резистентности / И.Г.Брындина, Г.Е.Данилов, Е.В.Минаева, С.Б.Егоркина, В.Л.Исаева // Мат. 18 съезда физиолог. общ-ва России (25-28 сентября 2001 г.). Казань; М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – С. 40.
2. Иммунологические и пульмональные аспекты нарушения нейротрофического контроля при колхициновой блокаде аксонов в блуждающем нерве / Г.Е.Данилов, И.Г.Брындина, Л.С.Исакова, Е.В.Минаева, В.Л.Исаева, В.В.Скурыгин, Е.П.Гребенкина, Д.В.Брындин, Е.В.Елисеева // Неврология-иммунология. – С.-Пб., 2001. – С. 64-66.
3. Легочной сурфактант и неспецифическая иммунологическая резистентность у крыс с разной степенью прогностической устойчивости к эмоциональному стрессу / И.Г.Брындина, С.Б.Егоркина, Е.В.Минаева, В.Л.Исаева // Вестник новых медицинских технологий. – 2002. – Т. IX, № 1. – С. 21-23

4. Роль индивидуальной устойчивости в изменениях легочного сурфактанта и неспецифической иммунологической резистентности при хроническом иммобилизационном стрессе / И.Г.Брындина, С.Б.Егоркина, Е.В.Минаева, А.В.Сорокин // Мат. IV съезда физиологов Сибири. – Новосибирск, 2002. – С. 37.
5. Некоторые физиологические механизмы ДЭНС-терапии / С.Б.Егоркина, А.В.Сорокин, Е.В.Минаева, Л.С.Исакова // Мат. междунар. симп. «Динамичекая электронейростимулирующая терапия. Новые рубежи и итоги эмпирического этапа развития». Екатеринбург, 2003, с. 32-37
6. Морфо-функциональные аспекты нарушения нейротрофического контроля при колхициновой блокаде аксонального транспорта в блуждающем нерве / Г.Е.Данилов, И.Г.Брындина, В.Л.Исаева, Е.В.Минаева, М.В.Зорина // Морфологические ведомости. – 2003. – № 1-2. – С. 13-15.
7. Центральные нейрхимические механизмы регуляции иммунной резистентности организма при хроническом эмоциональном стрессе / И.Г.Брындина, В.Л.Исаева, Е.В.Минаева, М.В.Зорина, Н.А.Никулина // Тез. мат. XII Всерос. конф. «Нейроиммунология». – Нейроиммунология. – 2003. – Т. 1, № 2. – С. 28.
8. Стресс-устойчивость и неспецифическая резистентность организма (тезисы) / И.Г.Брындина, Л.С.Исакова, С.Б.Егоркина, Е.В.Минаева // Ж. Аллергология и иммунология, 2004, т. 5, № 1, с. 213.
9. Reactivity to stress and non-specific resistance of an organism / I.G.Bryndina, L.S.Isakova, S.B.Egorkina, E.V.Minaeva // International Journal on Immunorehabilitation. – 2004. – V. 6, № 2. – P. 232.
10. Противовоспалительный механизм ДЭНС в условиях стресс-индуцированного иммунодефицита / С.Б.Егоркина, А.В.Сорокин, Е.В.Минаева, Л.С.Исакова, В.В.Малахов // Рефлексология. – 2006. – № 2(10). – С. 23-26.
11. Изменение показателей неспецифического звена иммунной системы у стресс-неустойчивых и стресс-устойчивых крыс при иммобилизации / Е.В.Минаева, Е.П.Гребенкина, Л.С.Исакова // Тез. докл. VI Сибирского физиологического съезда (25-27 июня 2008). – Барнаул: Принтэкспресс, 2008. – Т. 2. – С. 81.
12. Оценка состояния сенсорных систем и иммунного статуса у животных с различной стресс-устойчивостью / Л.С.Исакова, Е.В.Минаева, Е.В.Елисеева, А.А.Пермяков // Тез. докл. VII Всерос. конф. с международным участием, посвящ. 160-летию со дня рожд. И.П. Павлова «Механизмы функционирования висцеральных систем». – СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2009. – С. 182.
13. Влияние хронического стресса на систему неспецифической иммунологической резистентности у крыс с разной стресс-устойчивостью в условиях введения даларгина / Л.С.Исакова, И.Г.Брындина, Н.Н.Васильева, Е.В.Минаева, Ю.А.Кривоногова, М.В.Казакова //

Тематический сборник по аллергологии и иммунологии. Екатеринбург, Вестник Уральской Медицинской Академической Науки, 2010. – № 2/1 (29). – с. 141-142.

14. Иммунный ответ в условиях иммобилизационного стресса у крыс с различной стресс-устойчивостью / Е.П.Гребенкина, Е.В.Минаева, Л.С.Исакова // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова. Тезисы докладов. – М.-Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. – С. 158.
15. Показатели иммунного ответа при стресс-протекторных воздействиях / Е.П.Гребенкина, Е.В.Минаева // Актуальные вопросы современной физиологии и медицины: материалы межрегиональной научно-практической конференции 27-28 октября 2010 года. – Ижевск, 2010. – С. 42-43.
16. Изменение показателей неспецифического звена иммунной системы у крыс при внутрижелудочковом введении ангиотензина-II / Е.В.Минаева, Е.П.Гребенкина, Л.С.Исакова // Научные труды III Съезда физиологов СНГ. – Под ред. А.И. Григорьева, О.А. Крышталя, Ю.В.Наточина, Р.И.Сепиашвили. – М.: Медицина-Здоровье, 2011. – с. 234.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКТГ – адренкортикотропный гормон;
АМФ – аденозинмонофосфат;
ВИП – вазоактивный интестинальный пептид;
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;
ГКФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;
ЗФР – забуференный физиологический раствор;
ИЛ – интерлейкин;
КРФ – кортикотропный рилизинг-фактор;
МФС – моноклеарная фагоцитарная система;
НСТ – нитросиний тетразолий;
ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы;
ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты;
СТГ – соматотропный гормон;
ФР – физиологический раствор;
ЦНС – центральная нервная система.
Le. – общее количество лейкоцитов;
Э, % – процентное содержание эозинофилов;
Б, % – процентное содержание базофилов;
Н, % – процентное содержание нейтрофилов;
Л, % – процентное содержание лимфоцитов;
М, % – процентное содержание моноцитов;
ФИ, % – фагоцитарный индекс;
ФЧ – фагоцитарное число;
НСТ⁺ баз, % – процентное содержание позитивных нейтрофилов в базовых условиях;
НСТ⁺ стим., % – процентное содержание позитивных нейтрофилов в стимулированных условиях;
ИАН баз. – индекс активности нейтрофилов в базовых условиях;
ИАН стим. – индекс активности нейтрофилов в стимулированных условиях.