

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССА НА АПОПТОЗ CD4⁺/CD8⁺ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ *IN VIVO*

Шаравьева И.Л.¹, Гейн С.В.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Эндогенная опиоидная система представлена биологически активными молекулами, которые принимают участие в регуляции многих функций организма, в том числе в регуляции работы иммунной системы. Эндогенные опиоидные пептиды выделяются при стрессе и осуществляют коммуникации посредством опиатных рецепторов, которые обнаружены на большинстве иммуннокомпетентных клеток. Одним из важнейших инструментов регуляции процессов иммунной системы является апоптоз. Цель исследования – оценить влияние различных видов стресса на апоптоз CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в условиях блокады опиатных рецепторов. Объектом исследования служили белые беспородные мыши самцы, которых содержали в лабораторном виварии. Следующие виды стресса были изучены: иммобилизационный (6 ч в положении на спине), ротационный (60 мин: 10 мин вращение при 78 об/мин, 5 мин отдых), два вида острого холодового (10 мин или 60 мин при -20 °С), хронический холодовой (-4 °С по 4 часа ежедневно, на протяжении 7 суток). Опиатные рецепторы блокировали подкожным введением налоксона гидрохлорида в дозе 0,2 мг/кг за 20 мин до стресса и через 3 часа повторно, при длительности стресса более 3 часов. Спленциты окрашивали моноклональными антителами PE anti-mouse CD4 и PE anti-mouse CD8 (BioLegend, США), после инкубации и отмывки окрашивали реагентами для определения апоптоза Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя. Апоптоз лимфоцитов регистрировали на цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Установлено, что иммобилизационный стресс (продолжительностью 6 ч) и острый холодовой стресс (60 мин -20 °С) независимо от введения налоксона усиливают апоптоз CD8⁺ лимфоцитов селезенки мыши. Хронический холодовой стресс (-4 °С 4 часа / 7 суток) приводил к снижению процента апоптотических лимфоцитов селезенки только на фоне блокады опиатных рецепторов. Эффектов ротационного стресса и кратковременного острого холодового стресса (10 мин -20 °С) на процессы апоптоза зафиксировано не было. Таким образом, два вида стресса – иммобилизационный и острый холодовой – усиливали апоптоз CD8⁺ лимфоцитов, эндогенная опиоидная система не принимала участия в регуляции этих процессов. В условиях хронического холодового стресса на фоне введения налоксона отмечалось уменьшение связывания аннексина лимфоцитами селезенки мыши.

Ключевые слова: стресс, апоптоз, T-лимфоциты, опиоидная система, налоксон, иммунная система

Адрес для переписки:

Шаравьева Ирина Леонидовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614000, Россия, г. Пермь, ул. Ленина, 11.
Тел.: 8 (912) 781-81-25.
E-mail: irin.sh@gmail.com

Address for correspondence:

Sharavieva Irina L.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural
Branch, Russian Academy of Sciences
614000, Russian Federation, Perm, Lenina str., 11.
Phone: 7 (912) 781-81-25.
E-mail: irin.sh@gmail.com

Образец цитирования:

И.Л. Шаравьева, С.В. Гейн «Влияние различных видов стресса на апоптоз CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в условиях блокады опиатных рецепторов *in vivo*» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 2. С. 203–208. doi: 10.46235/1028-7221-1012-IOD

© Шаравьева И.Л., Гейн С.В., 2021

For citation:

I.L. Sharavieva, S.V. Gein “Influence of different kinds of stress on apoptosis of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes upon *in vivo* blockage of opiate receptors”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 2, pp. 203–208. doi: 10.46235/1028-7221-1012-IOD

DOI: 10.46235/1028-7221-1012-IOD

INFLUENCE OF DIFFERENT KINDS OF STRESS ON APOPTOSIS OF CD4⁺/CD8⁺ LYMPHOCYTES UPON *IN VIVO* BLOCKAGE OF OPIATE RECEPTORS

Sharavieva I.L.^a, Gein S.V.^b

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Abstract. The endogenous opioid system is involved in regulation of many body functions, including immune system regulation. Endogenous opioid peptides are released under stress and communicate with opiate receptors, which are found on most immune cells. Apoptosis is one of the most important instruments in the regulation of the immune system. The aim of this study was to evaluate effects of various types of stress upon apoptosis of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes under conditions of opiate receptor blockade. The objects of this study were white outbred male mice, been kept in laboratory vivarium. The following types of stress were studied: immobilization (6 h in the supine position), rotational (60 min: 10 min rotation at 78 rpm, 5 min rest), two types of acute cold (10 min or 60 min at -20 °C), chronic cold (-4 °C for 4 hours daily, for 7 days). Opiate receptors have been blocked by subcutaneous administration of naloxone hydrochloride at a dose of 0.2 mg/kg 20 minutes before stress, and again 3 hours later, with a stress duration of over 3 hours. Splenocytes were stained with PE-labeled monoclonal antibodies against murine CD4, and antibodies against mouse CD8 (BioLegend, USA); after incubation and washing, they were stained with reagents for determining apoptosis. V-FITC / 7-AAD annexin kit (Beckman Coulter, USA) according to the manufacturer's instructions. Lymphocyte apoptosis was recorded with a CytoFLEX S cytometer (Beckman Coulter, USA). Results. It was found that immobilization stress (lasting 6 h) and acute cold stress (60 min -20 °C), regardless of naloxone administration, enhance apoptosis of mouse CD8⁺ lymphocytes. Chronic cold stress (-4 °C 4 hours / 7 days) led to a decrease in apoptotic spleen lymphocyte numbers only during the blockade of opiate receptors. The effects of rotational stress and short-term acute cold stress (-20 °C, 10 min) upon apoptosis were not registered. Thus, two types of stress (immobilization and acute cold) caused intensification of CD8⁺ lymphocyte apoptosis; endogenous opioid system seems not to participate in regulation of these processes. Under conditions of chronic cold stress with naloxone injections, we have noted a decreased Annexin binding by spleen lymphocytes in mice.

Keywords: stress, apoptosis, T-lymphocytes, opioid system, naloxone, immune system

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7.

Введение

Эндогенная опиоидная система представлена физиологически активными биорегуляторными соединениями, осуществляющими коммуникации между нервной, эндокринной и иммунной системами [5]. Экспрессия опиатных рецепторов доказана на большинстве клеток иммунной системы. Разнообразные варианты стресса, а также их различная продолжительность, могут значительно отличаться по степени выраженности эндокринных изменений и, как следствие, с разной направленностью влиять на иммунный ответ [4].

Ранее нами было показано, что различные варианты стресса модулируют продукцию активных форм кислорода, антителогенез, пролиферацию, продукцию цитокинов, также показано, что

блокада опиатных рецепторов изменяет динамику отдельных показателей, в частности отменяет влияние стресса на антителогенез, продукцию IL-2, IFN γ , пролиферативный ответ [1, 2]. Одним из важнейших инструментов регуляции процессов иммунной системы является апоптоз.

Цель работы – изучить влияние различных вариантов стрессового воздействия на апоптоз CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов в условиях блокады опиатных рецепторов.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на белых мышцах-самцах массой тела 21–23 г. Животные содержались в лабораторном виварии при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используе-

мых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В работе использованы следующие варианты стресса: иммобилизационный (мышей фиксировали в положении на спине в течение 6 ч), ротационный (ротация мышей осуществлялась в течение 1 часа по 10 мин с перерывами 5 мин при 78 об/мин), холодовой в трех вариантах (10 мин или 60 мин при -20 °С, а также хронический холодовой стресс – охлаждение мышей при -4 °С в течение 4 часов ежедневно 7 суток подряд).

Блокаду опиатных рецепторов осуществляли путем введения налоксона гидрохлорида в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до начала любого варианта стресса, повторно через 3 часа при иммобилизации, дважды ежедневно при хроническом холодовом стрессе.

После окончания стрессового воздействия животных выводили из эксперимента. В случае ротационного и иммобилизационного стресса одна половина животных выводилась из эксперимента непосредственно после стресса, другая половина через 24 часа после окончания стрессового воздействия. Спленоциты гомогенизировали, эритроциты лизировали раствором NH₄Cl с ЭДТА, клетки окрашивали моноклональными

антителами PE anti-mouse CD4 и PE anti-mouse CD8 (BioLegend, США) в течение 20 минут в соответствии с инструкцией производителя, после чего клетки отмывали DPBS (Sigma, США) и окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя, и регистрировали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Результаты представлены в виде процента клеток, связавших аннексин, от всех спленоцитов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При оценке влияния различных вариантов стресса на апоптоз CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов селезенки мыши установлено, что иммобилизационный стресс независимо от блокады опиатных рецепторов усиливал апоптоз CD8⁺ лимфоцитов и не оказывал влияния на апоптоз CD4⁺-клеток. Ротационный стресс на апоптоз обеих субпопуляций Т-клеток не влиял (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ РОТАЦИОННОГО И ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА АПОПТОЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШИ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, M±m

TABLE 1. INFLUENCE OF ROTATIONAL AND IMMOBILIZATION STRESS ON THE PERCENTAGE OF APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES IN THE SPLEEN OF A MOUSE UNDER CONDITIONS OF BLOCKADE OF OPIATE RECEPTORS, M±m

| Экспериментальное воздействие Experimental exposure | Процент апоптических клеток Percentage of apoptotic cells | |
|---|--|------------------|
| | CD4 ⁺ | CD8 ⁺ |
| контроль control | 16,75±0,90% | 8,96±0,45% |
| ротационный стресс rotational stress | 19,38±1,73% | 8,74±0,19% |
| ротационный стресс + налоксон rotational stress + naloxone | 16,49±1,96% | 9,33±0,71% |
| иммобилизационный стресс immobilization stress | 16,78±1,32% | 13,25±0,52%* |
| иммобилизационный стресс + налоксон immobilization stress + naloxone | 19,16±1,89% | 13,55±0,89%* |
| налоксон naloxone | 13,87±0,66% | 10,12±1,18% |
| налоксон 2 раза naloxone twice | 10,67±1,91% | 9,58±0,61% |

Примечание. * – p < 0,05 к контролю (n = 9).

Note. *, p < 0.05 to control (n = 9).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА АПОПТОЗ CD4⁺/CD8⁺-ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШИ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, M±m

TABLE 2. INFLUENCE OF DIFFERENT VARIANTS OF COLD STRESS ON THE PERCENTAGE OF APOPTOSIS OF T-LYMPHOCYTES IN THE SPLEEN OF A MOUSE UNDER CONDITIONS OF BLOCKADE OF OPIATE RECEPTORS, M±m

| Экспериментальное воздействие Experimental exposure | Процент апоптических клеток Percentage of apoptotic cells | |
|--|--|------------------|
| | CD4 ⁺ | CD8 ⁺ |
| контроль control | 16,75±0,90% | 8,96±0,45% |
| -20 °С, 10 мин -20 °C, 10 min | 19,38±1,73% | 8,74±0,19% |
| -20 °С, 10 мин + налоксон -20 °C, 10 min + naloxone | 16,49±1,96% | 9,33±0,71% |
| -20 °С, 60 мин -20 °C, 60 min | 16,78±1,32% | 13,25±0,52%* |
| -20 °С, 60 мин + налоксон -20 °C, 60 min + naloxone | 19,16±1,89% | 13,55±0,89%* |
| +4 °С, 4 часа в сутки / 7 суток +4 °C, 4 hours a day / 7 days | 18,36±3,94% | 11,25±2,57% |
| +4 °С, 4 часа в сутки / 7 суток + налоксон +4 °C, 4 hours a day / 7 days + naloxone | 12,98±0,97%* | 9,59±1,18% |
| налоксон naloxone | 17,45±0,89% | 8,74±0,71% |
| налоксон 2 раза naloxone twice | 14,44±0,25% | 10,82±1,47% |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Через сутки после окончания ротационного или иммобилизационного стрессов эффектов на апоптоз лимфоцитов зафиксировано не было (данные не приводятся).

Далее представлены результаты влияния различных вариантов холодого стресса на апоптоз CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов селезенки мыши (табл. 2). Установлено, что в условиях 60 мин холодого стресса отмечалось независимое от налоксона усиление апоптоза CD8⁺ и не зафиксировано эффектов на апоптоз CD4⁺-клеток. Кратковременный 10-минутный холодого стресс на процессы программируемой клеточной гибели CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов влияния не оказывал. Хронический холодого стресс только на фоне блокады опиоидных рецепторов приво-

дил к снижению связывания с аннексином CD4⁺ лимфоцитов.

Выводы

Таким образом, как видно из полученных результатов, CD8⁺-лимфоциты более чувствительны к апоптоз-индуцирующему действию стресса. Апоптотическое действие было зафиксировано только у моделей иммобилизационного и 60-минутного холодого стресса. Эндогенная опиоидная система в регуляции данных процессов не участвовала, и только в случае хронического холодого стресса наблюдалось снижение процента апоптоза CD4⁺ лимфоцитов на фоне стресса при условии блокады опиоидных рецепторов.

В работах других авторов было показано, что хронический тепловой стресс способствовал экспрессии антиапоптозного фактора В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2) и ингибировал апоптоз лимфоцитов в селезенке и слизистой оболочке кишечника. С этим процессом связывают значительное увеличение количества CD4⁺T-клеток и соотношения CD4⁺/CD8⁺T-клеток в селезенке.

Также отмечалось повышение содержания белка теплового шока 70 (HSP70) [3], который может повышаться и при холодном стрессе. Более продолжительный иммобилизационный стресс (по 12 ч в течение 2 суток) приводил к повышению CD-95 опосредованного апоптоза спленоцитов, который мог быть отменен введением налоксона или налтрексона [6].

Список литературы / References

1. Гейн С.В., Шаравьева И.Л. Влияние ротационного и иммобилизационного стресса на продукцию IL-1 β , IL-2, IL-4 и IFN- γ спленоцитами в условиях блокады опиатных рецепторов *in vivo* // Доклады Академии наук, 2014. Т. 454, № 4. С. 485-487. [Gein S.V., Sharavieva I.L. Effect of rotation and immobilization stress on IL-1 β , IL-2, IL-4, and IFN- γ production by splenocytes under opiate receptor blockade *in vivo*. *Doklady Akademii nauk = Proceedings of the Academy of Sciences*, 2014, Vol. 454, no. 4, pp. 485-487. (In Russ.)]
2. Шаравьева И.Л., Гейн С.В. Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции антителогенеза при хроническом холодном стрессе // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2-2. С. 969-971. [Sharav'eva I. L., Gein S. V. The role of the endogenous opioid system in the regulation of antibody genesis during chronic cold stress. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2-2, pp. 969-971. (In Russ.)]
3. Huo C., Xiao C., She R., Liu T., Tian J., Dong H., Tian H., Hu Y. Chronic heat stress negatively affects the immune functions of both spleens and intestinal mucosal system in pigs through the inhibition of apoptosis. *Microb. Pathog.*, 2019, Vol. 136, 103672. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103672.
4. Khedri M., Samei A., Fasihi-Ramandi M., Taheri R. A. The immunopathobiology of T cells in stress condition: a review. *Cell Stress Chaperones*, 2020, Vol. 25, no. 5, pp. 743-752.
5. Sharp B.M., Roy S., Bidlack J.M. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J. Neuroimmunol.*, 1998, Vol. 83, no. 1-2, pp. 45-56.
6. Yin D., Tuthill D., Mufson R.A., Shia Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 8, pp. 1423-1428.

Авторы:

Шаравьева И.Л. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Sharavieva I.L., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Biochemistry of Development of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Гейн С.В. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; директор Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Gein S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University; Director, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021