

## ПОСТСТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ МЫШЕЙ

© 2019 г. И. Л. Шаравьева<sup>1\*</sup>, С. В. Гейн<sup>1,2</sup>

\*E-mail: irin.sh@gmail.com

<sup>1</sup>Филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), Пермь, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Поступила: 27.05.2019. Принята: 30.06.2019

Исследовано влияние острого и хронического холодового стресса в условиях блокады опиатных рецепторов на окислительную активность перитонеальных макрофагов мыши. Установлено, что острый холодовой стресс (4°C, 4 часа) независимо от блокады опиатных рецепторов угнетает зимозан-индуцированную окислительную активность перитонеальных макрофагов мыши. Хронический холодовой стресс (4°C, 4 часа, на протяжении 7 суток) на 7-е сут активирует зимозан-индуцированную окислительную активность макрофагов, блокада опиатных рецепторов приводит к отмене данной стимуляции. Увеличение концентрации кортикостерона отмечается как при остром, так и при хроническом переохлаждении и не зависит от блокады опиатных рецепторов.

**Ключевые слова:** холодовой стресс, кортикостерон, макрофаги, хемилюминесценция, опиатные рецепторы, налоксон

DOI: 10.31857/S102872210007278-0

**Адрес:** 614081 Пермь, ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» Уральского отделения Российской академии наук, Шаравьева Ирина Леонидовна.

Тел.: 8(342)2108759. E-mail: irin.sh@gmail.com

**Авторы:**

**Шаравьева И. Л.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

**Гейн С. В.**, д.м.н., заместитель директора по НИР «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ПГНИУ, Пермь, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Адаптация организма к изменениям условий окружающей среды обеспечивается комплексом механизмов, среди которых у позвоночных важнейшую роль играет стресс-реакция. Ее главной задачей является поддержание постоянства внутренней среды организма, мобилизация адаптивных механизмов, повышение резистентности к чужеродным агентам. Стресс-реакция носит

универсальный характер, однако, особенности конкретных воздействий окружающей среды приводят к вариативности функционального ответа организма. [1, 2].

Холодовой стресс сопровождается нейро-гуморальными изменениями, характерными для стресса любого генеза. Отмечается повышение уровней адреналина и норадреналина, глюкокортикоидов, катехоламинов, эндогенных опиоидных пептидов [3, 4, 5, 6], воздействие холода приводит к развитию в организме окислительного стресса.

Опиоидная система, которой традиционно отводится стресс-лимитирующая функция, может играть важную роль в адаптации организма к переохлаждению. По-видимому, эффекты холодового воздействия, такие как анальгезия, терморегуляция, модуляция иммунного ответа опосредуются через изменения в функционировании опиоидной системы [7, 8]. В свою очередь, переохлаждение организма приводит к изменению экспрессии генов опиатных рецепторов и концентрации циркулирующих пептидов [9, 5].

Под действием низких температур отмечают изменения в функционировании иммунной системы. В результате действия острого холодового стресса может происходить как усиление, так и ослабление отдельных иммунных функций и показателей, а так же состояние иммунного ответа в целом. Модулируются фагоцитоз, пролиферация, продукция Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ ), про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) [10, 11]. Ранее нами было показано, что направленность действия острого холодового стресса на функции макрофагов зависела как от исследуемого параметра, так и от времени воздействия, при этом блокада опиатных рецепторов существенно модифицировала иммунорегуляторные эффекты острого переохлаждения [12].

**Цель работы** – исследовать влияние острого и хронического холодового стресса на уровень кортикостерона в плазме крови и продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами в условиях блокады опиатных рецепторов у мышей *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили белые мыши самцы массой тела 20–22 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария 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, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В работе использовали два варианта холодового стресса – острый и хронический. В первом случае мышей охлаждали при 4°C в течение 4 часов однократно, во втором – по той же схеме ежедневно на протяжении 7 сут. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид вводили в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до охлаждения и повторно через 3 часа от первого введения. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – стресс (острое или хроническое переохлаждение), 3-я – стресс на фоне налоксона, 4-я – введение одного налоксона. Мышей выводили из эксперимента непосредственно после охлаждения, в модели хронического стресса на 7-е сутки ежедневного охлаждения. Декапитацию животных осуществляли под эфирным наркозом. Плазму

крови собирали, замораживали и хранили при –20 °С. Клетки перитонеального смыва выделяли по стандартной методике [13].

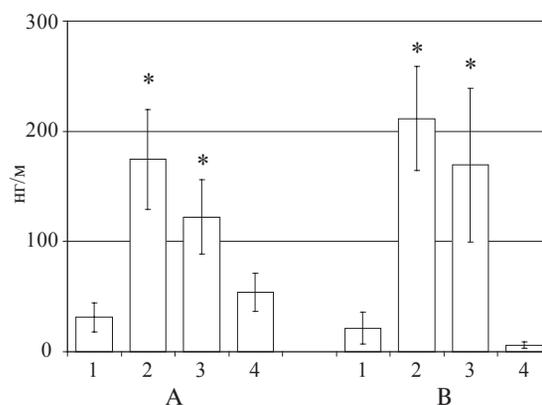
Оценку продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, каждая лунка содержала 10<sup>5</sup> клеток в 100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол 10<sup>-5</sup> М (Sigma). Регистрация результатов проводилась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем Enzo (США).

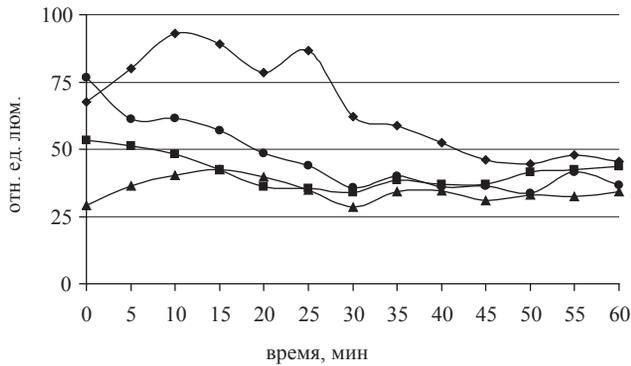
Статистическая обработка результатов проведена с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Все данные на рисунках представлены в виде средней и её стандартной ошибки (M $\pm$ m).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

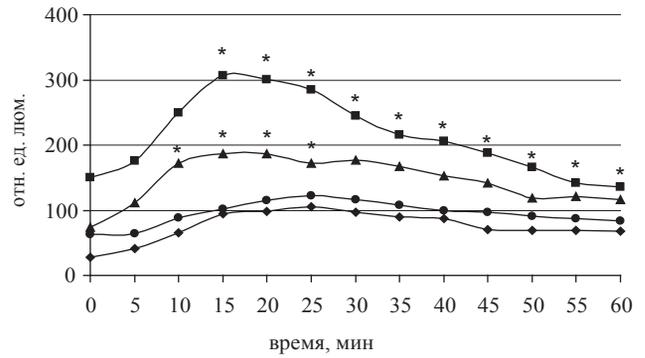
Установлено, что под действием как острого, так и хронического переохлаждения отмечалось значительное увеличение концентрации кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных, предварительное введение мышам налоксона на уровень кортикостерона в периферической крови статистически значимого влияния не оказывало (Рис. 1).



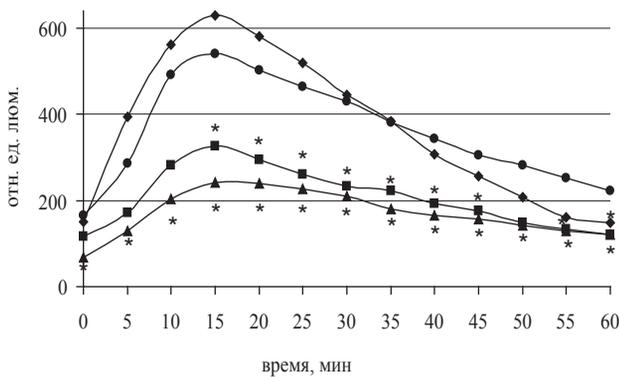
**Рис. 1.** Влияние хронического (А) и острого (Б) холодового стресса на уровень кортикостерона в крови мышей в условиях блокады опиатных рецепторов. Группы животных: 1 – контроль, 2 – стресс, 3 – стресс+налоксон, 4 –налоксон (n=11).



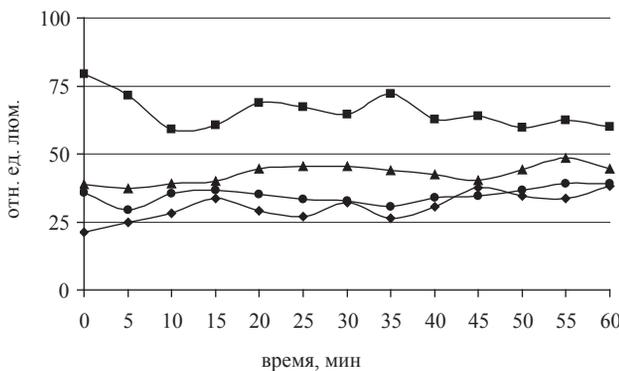
**Рис. 2.** Влияние острого холодового стресса (4°C, 4 часа) на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▼ - наллоксон. \* -  $p < 0,05$  к контролю, (n=9).



**Рис. 5.** Влияние хронического холодового стресса на зимозан-стимулированную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▼ - наллоксон. \* -  $p < 0,05$  к контролю, (n=9).



**Рис. 3.** Влияние острого холодового стресса (4°C, 4 часа) на зимозан-стимулированную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▼ - наллоксон. \* -  $p < 0,05$  к контролю, (n=9).



**Рис. 4.** Влияние хронического холодового стресса на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. • - контроль; ■ - стресс; ▲ - стресс+наллоксон; ▼ - наллоксон. \* -  $p < 0,05$  к контролю, (n=9).

Установлено, что острый холодовой стресс, а также стресс на фоне блокады опиатных рецепторов не влияет на продукцию активных форм кислорода в спонтанных культурах перитонеальных клеток. В стимулированных зимозаном культурах острое переохлаждение оказывало угнетающее воздействие на динамику кислородного взрыва на всем протяжении наблюдения. На фоне блокады опиатных рецепторов наблюдалось значимое угнетение продукции АФК перитонеальными макрофагами мыши с 20 мин наблюдения.

Хронический холодовой стресс не оказывал влияния на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши (Рис. 2). В стимулированных зимозаном культурах под действием хронического холодового стресса происходит усиление продукции АФК с 15 по 60 минуту исследования. В 3-й группе животных, при воздействии хронического холода на фоне блокады опиатных рецепторов отмечается усиление кислородзависимой микробицидности с 10 по 25 минуту исследования (Рис. 3, 4, 5). Таким образом, блокада опиатных рецепторов приводила к частичной отмене эффектов холодового стресса на продукцию АФК макрофагами.

Таким образом, можно отметить модулирующее действие холодового стресса на функции перитонеальных макрофагов, которое в зависимости от продолжительности воздействия может иметь стимулирующую или угнетающую направленность. Эндогенная опиоидная система принимает важное участие в регуляции функций макрофагов при переохлаждении.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Холодовой стресс модулирует функции иммунной системы: под его влиянием отмечено увеличение тимуса, активация клеточно-опосредованного иммунитета, повышение метаболической активности макрофагов, снижение фагоцитоза, усиление продукции АФК и оксида азота [3, 13, 14, 15, 16]. Ранее нами было показано, что короткий холоддовой стресс при  $-20^{\circ}\text{C}$  модулировал окислительную активность перитонеальных макрофагов в зависимости от времени экспозиции. Холодовой стресс при  $-20^{\circ}\text{C}$  на протяжении 10 минут приводил к угнетению выраженности реакции ЛЗХЛ, тогда как такое же охлаждение на протяжении 60 минут приводило к стимуляции выраженности реакции ЛЗХЛ [11]. В данном исследовании острый холоддовой стресс при  $4^{\circ}\text{C}$  на протяжении 4 часов приводил к независимому от налоксона угнетению кислородного взрыва в зимозан-стимулированных культурах. Хронический же 4 часовой стресс, напротив, усиливал данную реакцию.

Различия в направленности действия моделей холоддового стресса могут быть связаны в первую очередь с динамикой гормонального сдвига при стрессе, в том числе с активацией эндогенной опиоидной системы. Однако, возможно, при различных режимах охлаждения изменяется динамическая активность периферических термочувствительных афферентов, что приводит к изменению иммунных показателей [17].

Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *McEwen B. C., Wingfield J. C.* What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress 2011, 57, 2, 1–16.
2. *Поликарпов И. А., Кондратьев Е. Ю., Петровский Д. В., Новиков Е. А.* Межпопуляционная изменчивость эндокринно-метаболической реакции на холоддовой стресс у красной полевки (*Myodes rutilus*). Журнал общей биологии 2016, 77, 4, 284–292. [*Polikarpov I. A., Kondratyuk E. Yu., Petrovsky D. V., Novikov E. A.* Interpopulation variability of endocrine-metabolic reaction to cold stress in northern red-backed vole (*Myodes rutilus*). *Biology Bulletin Reviews* 2016, 77, 4, 284–292.]
3. *Sesti-Costa R., Baccan G. C., Chedraoui-Silva S., Mantovani B.* Effects of acute cold stress on phagocytosis of apoptotic cells: the role of corticosterone *Neuroimmunomodulation* 2010, 17(2), 79–87.
4. *Sugama S., Takenouchi T., Fujita M., Kitanib H., Hashimoto M.* Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1 $\beta$  expression in astroglial cells in rat brain. *Journal of Neuroimmunology* 2011, 233(1–2), 29–36.
5. *Pancheri P., Zichella L., Fraioli F., Carilli L., Perrone G., Biondi M., Fabbri A., Santoro A., Moretti C.* ACTH, beta-endorphin and met-enkephalin: peripheral modifications during the stress of human labor. *Psychoneuroendocrinology* 1985, 10(3), 289–301.
6. *Suckow M. A., Terril L. A., Grigdesby C. F., March P. A.* Evaluation of Hypothermia-Induced Analgesia and Influence of Opioid Antagonists in Leopard Frogs (*Rana pipiens*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1999, 63(1), 39–43.
7. *Salmi P., Kela J., Arvidsson U., Wahlestedt C.* Functional interactions between  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors in rat thermoregulation. *European Journal of Pharmacology* 2003, 458(1–2), 101–106.
8. *Cadet P., Zhu W., Mantione K. J., Baggerman G., Stefan G. B.* Cold stress alters *Mytilus edulis* pedal ganglia expression of mu opiate receptor transcripts determined by real-time RT-PCR and morphine levels. *Brain Res Mol Brain Res* 2002, 99(1), 26–33.
9. *Sesti-Costa R., Ignacchiti M. D., Chedraoui-Silva S., Marchi L. F., Mantovani B.* Chronic cold stress in mice induces a regulatory phenotype in macrophages: correlation with increased 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase expression. *Brain Behav Immun* 2012, 26(1), 50–60.
10. *Zhu G. F., Chancellor-Freeland C., Berman A. S., Kage R., Leeman S. E., Beller D. I., Black P. H.* Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages. *J. Neurosci* 1996, 16(11), 3745–3752.
11. *Гейн С. В., Шаравьева И. Л.* Влияние холоддового стресса на функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши в условиях блокады опиоидных рецепторов. *Российский физиологический журнал им. Сеченова* 2016, 102, 188–194. [*Gein S. V., Sharav'eva I. L.* Effects of Cold Stress on the Functional Activity of Mouse Peritoneal Macrophages in Conditions of Opiate Receptor Blockade. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 2017, 47, 5, 524–527.]
12. *Иммунологические методы.* Под ред. Г. Фримеля, М., 1987, 472. [*Immunological methods* / Ed. H. Fritemel, M., 1987, 472 p.]
13. *Беседин И. М., Бажин А. С., Мельников В. П., Калёнова Л. Ф.* Моделирующий эффект температурных воздействий слабой интенсивности на психонервно-иммуноэндокринную систему теплокровного организма. *Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование* 2016, 2,2, 144–159. [*Besedin I. M., Bazhin A. S., Melnikov V. P., Kalenova L. F.* Simulating effect of low intensity temperature actions on psycho-neuro-immuno-endocrine system of warm-blooded organisms. *Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology* 2016, (2), 144–159.]
14. *Гейн С. В., Шаравьева И. Л.* Иммуномодулирующие эффекты холоддового стресса. *Успехи современной биологии* 2018, 138, 3, 243–250. [*Gein S. V., Sharav'eva I. L.* Immunomodulating Effects of Cold Stress. *Biology bulletin reviews* 2018, 6, 482–488.]

15. Salman H., Bergman M., Bessler H., Alexandrova S., Beilin B., Djaldetti M. Hypothermia affects the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand* 2000, 68(3), 431–16.
16. Sandhu M. A., Zaib A., Anjum M. S., Qayyum M. Empirical evidence of cold stress induced cell mediated and humoral immune response in common myna (*Sturnus tristis*). *Int J Biometeorol* 2015, 59(11), 1607–13.
17. Козырева Т. В., Елусеева Л. С. Иммуный ответ и содержание кортикостероидов при различных режимах охлаждения. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2002, 4, 384–387. [Kozyreva T. V., Eliseeva L. S. The immune response and the content of corticosteroids with different modes of cooling. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002, 4, 384–387.]

## POSTSTRESSOR CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF CELLS OF PERITONEAL CAVITY OF MICE

© 2019 I. L. Sharav'eva<sup>1\*</sup>, S. V. Gein<sup>1,2</sup>

*E-mail: irin.sh@gmail.com*

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UrB RAS, Perm, Russia;*

<sup>2</sup>*Perm State University, Perm, Russia*

**Received:** 27.05.2019. **Accepted:** 30.06.2019

The effect of acute and chronic cold stress in the conditions of the blockade of opiate receptors on the oxidative activity of mouse peritoneal macrophages was studied. It was established that acute cold stress (4°C, 4 hours), regardless of the blockade of opiate receptors, inhibits zymosan-induced oxidative activity of mouse peritoneal macrophages. Chronic cold stress (4°C, 4 hours, for 7 days) on the 7<sup>th</sup> day activates zymosan-induced oxidative activity of macrophages, blockade of opiate receptors leads to the cancellation of this stimulation. An increase in the concentration of corticosterone is observed both in acute and in chronic hypothermia and does not depend on the blockade of opiate receptors.

*Key words:* cold stress, corticosterone, macrophages, chemiluminescence, opiate receptors, naloxone

### Authors:

**Sharav'eva I. L.**, ✉ PhD Biological Sciences, scientific researcher of the laboratory of biochemistry of microorganism development of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia; Perm, Institute of ecology and genetics of microorganisms, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79127818125, **E-mail:** irin.sh@gmail.com

**Gein S. V.**, MD, Professor, deputy director for research at the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, professor of the Department of microbiology and immunology of the Biology Faculty of the Perm State University, Perm, Russia.