

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ОPIOИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА АНТИТЕЛОГЕНЕЗ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ СПЛЕНОЦИТОВ ПРИ СТРЕССЕ

С. В. Гейн, И. Л. Шаравьева¹

Установлено, что ротационный и иммобилизационный стресс оказывают разнонаправленное влияние на количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и пролиферативный ответ спленоцитов. Ротационный стресс приводит к усилению образования АОК и стимуляции спонтанной пролиферативной активности спленоцитов. Блокада опиоидных μ -рецепторов налоксоном, но не δ -рецепторов налтриндолом, отменяла стимулирующие эффекты ротации. Напротив, иммобилизационный стресс приводит к угнетению показателей гуморального иммунного ответа и снижает спонтанную и индуцированную пролиферативную активность спленоцитов. Блокада опиоидных рецепторов налоксоном нивелирует угнетающие эффекты иммобилизации, менее выраженное действие оказывает налтриндол. В обоих вариантах стресса вовлеченность опиоидной системы в регуляцию количества АОК отмечается в период индукции иммунного ответа.

Ключевые слова: стресс; пролиферация; опиоиды; антителогенез; налоксон

ВВЕДЕНИЕ

Опиоидные пептиды — группа физиологически активных биорегуляторных факторов, реализующая свои эффекты через взаимодействие с опиоидными рецепторами (μ , δ , κ) [10].

При стрессе, травмах, психоэмоциональных состояниях и физических нагрузках опиоидные пептиды играют решающую роль в регуляции иммунных реакций как на местном, так и на системном уровнях [3]. Несмотря на общий механизм патогенеза, различные виды наиболее часто встречающихся стрессорных воздействий (вращение, ограничение подвижности, переохлаждение и др.) могут значительно различаться по степени выраженности гормональных изменений и, как следствие, влиянию на иммунный ответ [4]. Ранее нами показано, что ротационный стресс налоксон-зависимо усиливал образование АОК в лимфатическом узле и стимулировал выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа в условиях локального введения антигена [2], а введение бета-эндорфина мышам усиливало антителогенез, пролиферативный ответ спленоцитов и продукцию IL-4 *in vivo* [1].

Цель работы — исследовать влияние блокады опиоидных μ , δ -рецепторов на антителогенез и пролиферативный ответ спленоцитов мыши при ротационном и иммобилизационном стрессе *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на беспородных 280 мышак-самцах средней массой 18 – 20 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария, при двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Выведение из эксперимента

мышей проводили путем декапитации под эфирным наркозом. Каждая группа содержала от 9 до 13 животных. Ротацию мышей производили в течение 60 мин по 10 мин с перерывами по 5 мин при 78 об/мин, иммобилизацию — в течение 6 ч (фиксация в положении на спине). Неселективный μ -, δ -антагонист опиоидных рецепторов налоксона гидрохлорид в дозе 0,2 мг/кг (“Narcan”, США) и селективный δ -антагонист налтриндола гидрохлорид (ICN, США) в дозе 0,1 мг/кг вводили подкожно за 20 мин до стресса, а также через 3 ч после начала стресса у животных, подвергнутых иммобилизации.

Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я — контрольная, 2-я — часовой ротационный стресс или шестичасовой иммобилизационный стресс, 3-я — часовой ротационный стресс или шестичасовой иммобилизационный стресс на фоне блокады опиоидных δ -рецепторов налтриндолом, 4-я — часовой ротационный стресс или шестичасовой иммобилизационный стресс на фоне блокады μ , δ -рецепторов налоксоном, 5-я — введение одного налтриндола, 6-я — введение одного налоксона. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия немедленно иммунизировали эритроцитами барана внутрибрюшинно однократно (10^8 клеток в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl). На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по N. K. Jerne [6]. Одна половина животных получала экспериментальные воздействия перед введением сенсibilизирующей дозы антигена, что соответствовало периоду индукции иммунного ответа, другая — по той же схеме на 4-е сутки эксперимента, что соответствовало эффекторному периоду иммунного ответа.

Для оценки пролиферативной активности спленоцитов животных сразу по окончании стресса выводили из эксперимента, извлекали селезенку, гомогенизировали в пластиковом гомогенизаторе, полученные спле-

¹ Группа радиоизотопных исследований (руководитель — проф. С. В. Гейн) Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13.

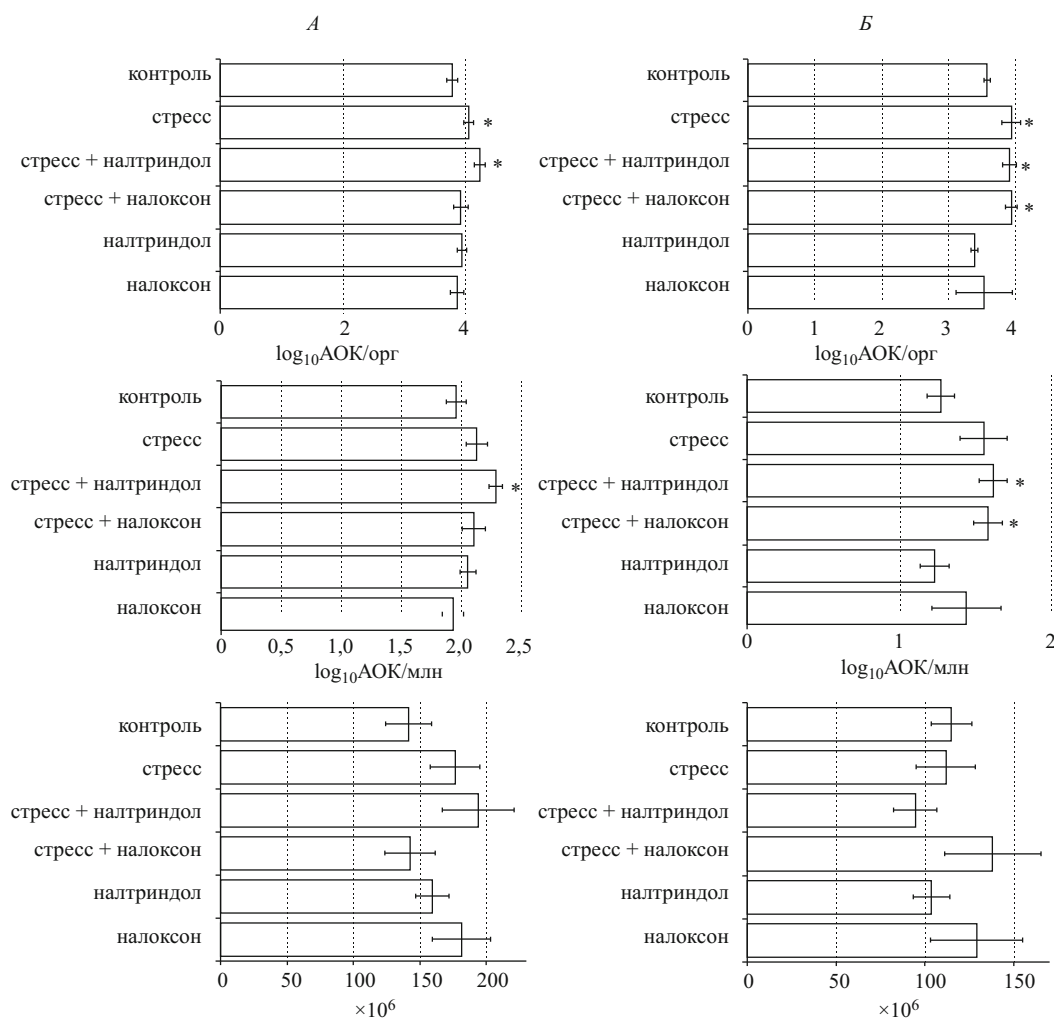


Рис. 1. Влияние ротационного стресса на фоне блокады опиоидных рецепторов на абсолютное (на орган), относительное (на 1 млн клеток) количество АОК и клеточность селезенки в индуктивный (А) и эффекторный (Б) периоды иммунного ответа в условиях системной иммунизации ЭБ. * — $p < 0,05$ к контролю.

ноциты дважды отмывали холодной средой RPMI-1640. Клетки ($5 \cdot 10^5$ /мл) культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки (“Биолот”), 2 мМ глутамин и 100 мкг/мл бензилпенициллина натриевую соль (ОАО “Синтез”, г. Курган, Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина. В качестве Т-клеточного митогена использовали конканавалин А (MP Biomedicals, США) в концентрации 20 мкг/мл, в качестве В-клеточного митогена использовали липополисахарид (ЛПС, *E.coli* B55:O5, “Sigma”) в концентрации 10 мкг/мл. Пролиферативную активность оценивали через 72 ч по интенсивности включения ³H-метилтимидина, который вносили за 18 ч до окончания культивирования. Радиоактивность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Guardian (“Wallac”, Финляндия).

Статистический анализ результатов проводили с использованием факторного анализа и непарного *t*-критерия Стьюдента для межгруппового сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях системной иммунизации у мышей, подвергнутых ротационному стрессу в период индукции иммунного ответа, наблюдалось статистически значимое усиление интенсивности образования АОК в абсолютном выражении (рис. 1). На фоне блокады опиоидного δ -рецептора стимулирующее действие стресса на абсолютное число АОК не модифицировалось, в то время как налоксон стимулирующее действие стресса на абсолютный антителогенез отменял, и показатели данной группы не имели значимых отличий в сравнении с контрольной группой. Относительный показатель количества АОК на фоне ротационного стресса не изменялся. На фоне налтриндола стресс приводил к усилению относительных показателей антителогенеза. На фоне налоксона данный показатель не отличался от такового у животных контрольной группы. При изолированном введении блокаторов опиоидных рецепторов количество АОК также не отличалось от показателей контрольной группы. На клеточность селезенки мышей ротационный стресс и антагонисты опиоид-

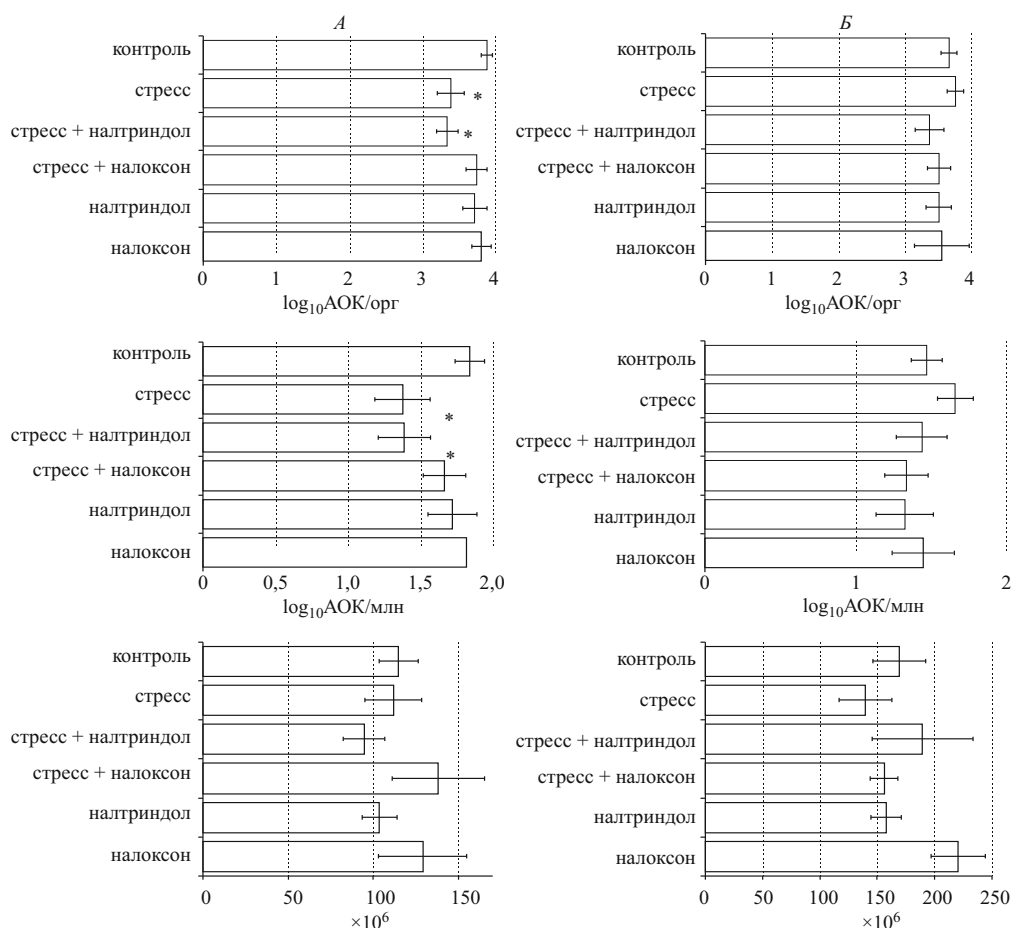


Рис. 2. Влияние иммобилизационного стресса на фоне блокады опиоидных рецепторов на абсолютное (на орган), относительное (на 1 млн клеток) количество АОК и клеточность селезенки в индуктивный (А) и эффекторный (Б) периоды иммунного ответа в условиях системной иммунизации ЭБ. * — $p < 0,05$ к контролю.

ных рецепторов статистически значимого влияния не оказывали.

В эффекторный период иммунного ответа под влиянием ротационного стресса было зафиксировано статистически достоверное увеличение абсолютного числа АОК. Данный показатель на фоне блокады опиоидных рецепторов не модифицировался. Относительное число АОК статистически значимо усиливалось только при стрессе на фоне опиоидных антагонистов. Изолированное введение налоксона и налтриндола значимого эффекта на количество АОК не оказывало. Клеточность селезенки в эффекторный период иммунного ответа статистически достоверно не изменялась.

В условиях системной иммунизации у мышей, подвергнутых иммобилизационному стрессу, наблюдалось статистически значимое угнетение интенсивности антителогенеза как по абсолютным, так и по относительным показателям АОК (рис. 2). На фоне блокады опиоидного δ -рецептора угнетающее действие стресса на антителогенез не модифицировалось, в то время как налоксон угнетающее действие стресса на относительное и абсолютное число АОК отменял, и показатели животных 4-й группы статистически зна-

чимо не отличались от контроля. Изолированное введение антагонистов опиоидных рецепторов, как было неоднократно показано выше, какого-либо значимого влияния на динамику количества АОК как по относительным, так и по абсолютным показателям не оказывало. На клеточность селезенки иммобилизационный стресс, как и другие экспериментальные воздействия статистически значимо не влияли.

В эффекторный период иммунного ответа в условиях системного введения эритроцитов барана статистически значимого действия 6-часовой иммобилизации на абсолютное и относительное количество АОК, а также на клеточность селезенки не зарегистрировано.

Установлено, что у мышей, подвергнутых ротации, увеличивалась спонтанная пролиферативная активность спленоцитов (рис. 3). Введение налтриндола не отменяло стимулирующего действия ротационного стресса, в то время как введение налоксона (блокада δ , μ -рецепторов) приводило к отмене стресс-индуцированного усиления пролиферативного ответа спленоцитов. Изолированное введение блокаторов на данный показатель влияния не оказывало. Внесение в культуры В-клеточного митогена липополисахарида (ЛПС) и поликлонального активатора конканавалина А (Кон А)

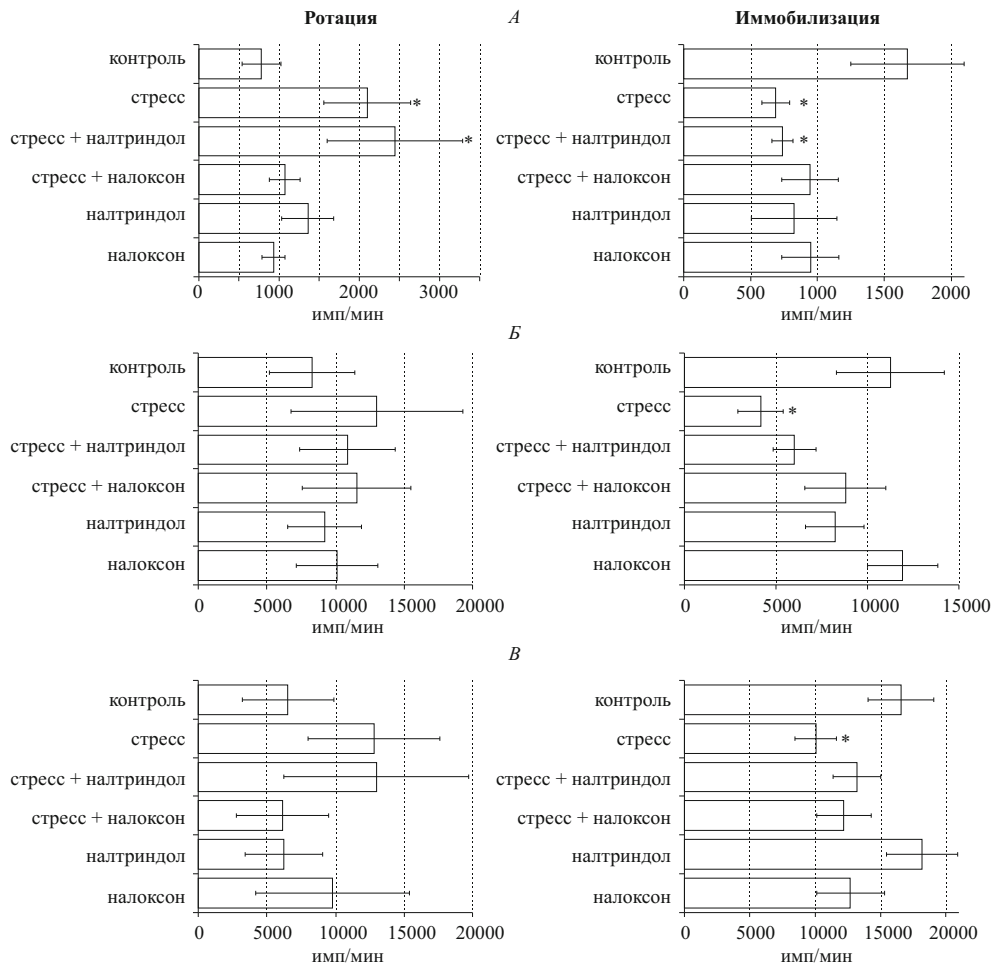


Рис. 3. Влияние ротационного и иммобилизационного стресса на фоне блокады опиоидных рецепторов на спонтанную (А), ЛПС- (В) и Кон А-индуцированную (Б) пролиферацию спленоцитов. * — $p < 0,05$ к контролю.

приводило к выраженному усилению захвата ³H-тимидина спленоцитами по сравнению с нестимулированными культурами. В то же время статистически значимого влияния стресса на пролиферацию зафиксировано не было.

Установлено, что иммобилизационный стресс уменьшал пролиферативную активность спленоцитов как в неактивированных культурах, так и в присутствии ЛПС и Кон А. Блокада δ-рецепторов налтриндолом в спонтанных культурах не отменяла стимулирующего действия стресса, а в культурах с ЛПС и Кон А приводила к снижению интенсивности супрессорного действия стресса на пролиферацию клеток селезенки. Блокада μ-рецепторов на фоне иммобилизационного стресса приводила к отмене угнетающего действия на спонтанный, ЛПС- и Кон А-стимулированный пролиферативный ответ спленоцитов. Изолированное введение блокаторов статистически значимо не изменяло динамику захвата радиоактивной метки спленоцитами.

В зависимости от вида стрессорного воздействия эндогенная опиоидная система оказывает разнонаправленное влияние на количество АОК и пролиферативный ответ спленоцитов. На фоне ротационного

стресса выраженность иммунных реакций усиливалась, в то время как на фоне иммобилизации наблюдалось снижение выраженности антителогенеза и интенсивности пролиферации. В обоих случаях эффект нивелировался опиоидными антагонистами, в большей степени налоксоном, который в используемой дозе является преимущественно μ-антагонистом [8]. Селективная блокада δ-рецепторов оказывала менее значимое влияние, преимущественно на фоне иммобилизационного стресса и индуцированного им снижения функциональной активности спленоцитов. На фоне ротации введение мышам δ-антагониста к модификации эффектов стресса не приводило, а в отдельных случаях, напротив, способствовало усилению выраженности иммунных показателей, в частности, образования АОК. Ранее нами показано, что в условиях локального введения антигена налтриндол на фоне ротационного стресса усиливал процесс образования АОК в лимфатическом узле [2]. Известно, что три класса эндогенных опиоидных пептидов взаимодействуют с тремя типами опиоидных рецепторов: мю (μ), дельта (δ) и каппа (κ). β-Эндорфин связывается примерно с равной аффинностью с μ- и δ-опиоидными ре-

цепторами, тогда как энкефалины связываются с приблизительно 20-кратной степенью аффинности с μ -опиоидными рецепторами [9]. Учитывая, что основной эндогенной субстанцией, опосредующей свои эффекты через опиоидные рецепторы при стрессе является бета-эндорфин, пептид со смешанным спектром связывания (в большей степени μ , в меньшей — δ) [9], использование налоксона представляется более эффективным. Известно, что концентрация β -эндорфина в плазме крови значительно изменяется при различных стрессорных воздействиях. По данным литературы, при двукратной 10- и 20-минутной ротации уровень β -эндорфина возрастал в 3 и 4 раза, соответственно, сразу после стресса, в 6 и 10 раз, соответственно, спустя 6 ч после ротации, уровень кортикостерона увеличивался в 3–4 раза [5]. Имобилизационный стресс, напротив, является вариантом более тяжёлого воздействия, сопровождается, прежде всего, высокими уровнями глюкокортикоидов в плазме крови. К моменту окончания 6-часовой иммобилизации уровень β -эндорфина оставался повышенным только в 2 раза по сравнению с базальным, в то время как уровень кортикостерона превышал базальный в 10 раз [7]. Известно, что глюкокортикоиды и эндогенные опиоиды находятся в тесной взаимосвязи и в процессе развития стресс-реакции оказывают друг на друга взаимные регуляторные влияния. Установлено, что однократные инъекции кортизола и адреналина модулировали уровень β -эндорфина в плазме крови [4], в то же время внутривенное введение β -эндорфина приводило к снижению уровня кортизола и адреналина у стрессированных животных [11], что в конечном счёте обуславливает появление разнонаправленных эффектов у эндогенных опиоидов в различных стрессорных моделях.

ВЫВОДЫ

1. Ротационный стресс у мышей приводит к усилению образования антителообразующих клеток и сти-

муляции спонтанной пролиферативной активности спленоцитов. Блокада опиоидных μ -рецепторов налоксоном отменяет стимулирующие эффекты ротации. Вовлечённость опиоидной системы в регуляцию количества антителообразующих клеток отмечается только в индуктивную фазу иммунного ответа.

2. Имобилизационный стресс у мышей приводит к угнетению показателей гуморального иммунного ответа и пролиферативной активности спленоцитов. Блокада опиоидных рецепторов налоксоном нивелирует угнетающие эффекты иммобилизации, менее выраженное действие оказывает введение δ -антагониста налтриндола.

Работа поддержана грантом программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и грантом РФФИ № 11-04-96000-р-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Гейн, Т. А. Баева, В. О. Небогатиков и др., *Бюл. экпер. биол.*, **152**(11), 526 – 529 (2011).
2. С. В. Гейн, И. Л. Шаравьева, Т. А. Баева и др., *Вестн. Уральской медицинской академической науки*, № 3, 70 – 73 (2005).
3. S. L. Bowers, S. D. Bilbo, F. S. Dhabhar, et al., *Brain, Behavior, and Immunity*, **22**, 105 – 113 (2008).
4. G. M. Goodwin, W. J. Muir, J. R. Seckl, et al., *J. Affect Disord.*, **26**(2), 73 – 83 (1992).
5. K. D. Hale, V. K. Ghanta, D. K. Gauthier, et al., *Neuroimmunomodul.*, **9**, 34 – 40 (2001).
6. N. K. Jerne, A. A. Nordin, *Science*, **140**(3365), 405 – 405 (1963).
7. K. Iwai, T. Takahashi, T. Nakahashi, et al., *Hypertens Res.*, **31**, 977 – 986 (2008).
8. M. J. Millan, A. Czlonkowski, A. Lipkowski, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**(1), 342 – 350 (1989).
9. L. M. Oswald, G. S. Wand, *Physiology & Behavior*, **81**, 339 – 358 (2004).
10. E. M. Smith, *Brain, Behavior, and Immunity*, **22**, 3 – 14 (2008).
11. R. Sunal, N. Tuncel, N. Sümer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **496**, 158 – 160 (1987).

Поступила 25.04.12

EFFECT OF OPIOID RECEPTOR BLOCKADE ON ANTIBODY RESPONSE AND PROLIFERATIVE RESPONSE UNDER STRESS CONDITIONS

S. V. Gein and I. L. Sharav'eva

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Goleva 13, Perm, 614081, Russia

It is established that rotation and immobilization stress produces bidirectional effect on AFC number in spleen and on proliferative response of splenocytes. The rotation stress results in augmentation of AFC formation and promotion of spontaneous proliferative activity of splenocytes. The μ -opioid receptor blockade with naloxone, but not δ -receptor blockade with naltrindole, abolished the effects of rotation. In contrast, the immobilization stress caused the suppression of the parameters of humoral immune response and lowered spontaneous and induced proliferative activity of splenocytes. The opioid receptor blockade with naloxone was found to level the suppressive effects of immobilization, while naltrindole exhibited a less pronounced effect. Both variants of stress demonstrated the involvement of opioid system in regulation of AFC number during induction of the immune response.

Keywords: stress; proliferation; opioids; antibody response; naloxone