

**Семенова Я.-М.О.**

## ВПЛИВ ПОМІРНОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ НА ПЕРЕРОЗПОДІЛ КЛІТИН ІМУННОЇ СИСТЕМИ

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна

**Senenova Ya.-M.O.**

### INFLUENCE OF A MODERATE COLD STRESS ON REDISTRIBUTION OF IMMUNE SYSTEM CELLS

State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

#### **Резюме**

*Актуальність. Робота присвячена вивченню перерозподілу клітин імунної системи при помірному холодОВОМУ стресі, що має теоретичне і практичне значення.*

*Мета дослідження: вивчення впливу одноразового відтворення помірному холодОВОМУ стресу на перерозподіл клітин в межах імунної системи.*

*Дизайн. Експерименти проведено на самцях мишей лінії C57BL віком 6-8 тижнів і масою 18-20 г. Гострий холодОВИЙ стрес індукували витримуванням мишей при +4°C протягом 15 хв. Через 4 та 24 год досліджували показники кісткового мозку, тимуса і селезінки, фази клітинного циклу і активність апоптозу, а також гематологічні показники, включаючи лейкоцитарну формулу і вміст ретикулоцитів у крові.*

*Результати. Короткочасний помірний холодОВИЙ стрес характеризується розвитком через 24 год лейкоцитозу, ретикулоцитопенії, вираженим зменшенням клітинних показників в кістковому мозку, тимусі і селезінці, суттєвим зниженням кількості тимоцитів у S і G2-M+S фазах і значним збільшенням кількості тимоцитів і спленоцитів в апоптозі, що можна розцінювати як інтенсивний клітинний стресОВИЙ перерозподіл.*

*Висновки. У розвитку холодОВОГО стресу приймає участь кістковомозкова клітинна мобілізація, міграція лімфоцитів і гранулоцитів із тимуса і селезінки, пригнічення проліферативної активності і підвищення апоптозу клітин тимуса і селезінки, що свідчить про сполучення при холодОВОМУ стресі катаболічних і регуляторних процесів в органах імунної системи. Отримані дані про особливості холодОВОЇ стресОВОЇ реакції можуть бути використані на шляхах пошуку нових методів корекції, небажаних для функціонування імунної системи стресОВИХ ефектів.*

**Ключові слова:** *холодОВИЙ стрес, імунна система, гемопоетичні стовбурові клітини, лімфоцити.*

#### **Вступ**

ХолодОВИЙ стрес є психосоматичною реакцією організму. Сильнодіючі фактори спричиняють в організмі процеси, що визначені Сельє як «загальний адаптаційний синдром». В основі реакції лежить збудження в осі гіпоталамус-гіпофіз-кора наднирників і активація вегетативної нервової системи, головним чином, її симпатичного відділу. Як ключові, діючі на імунну систему, фактори, розглядаються АКТГ і стимульована ним

продукція стероїдних гормонів наднирників, а також виділені у підвищеній кількості катехоламіни. Є дані, що імуносупресивний ефект при стресі більше індукується не глюкокортикоїдами, а катехоламінами і простаглантинами [1]. Відомо, що стимуляція  $\alpha$ - і  $\beta$ -рецепторів при стресі сприяє виходу лімфоцитів і гранулоцитів із селезінки [2] і забезпечує нейтрофіліоз [3]. Основну роль у продукції ГМ-КСФ при стресі відіграє PI3K/Akt-залежний сигнальний каскад [4]. Інші ен-

докринні залози приймають меншу участь у розвитку стресу [5].

Реакція лімфоцитів, гранулоцитів і моноцитів залежить, з одного боку, від концентрації глюкокортикоїдів і катехоламінів, а з іншого, від вираженості на клітинах імунної системи рецепторів до цих факторів. Сильні класичні стреси викликають катаболічні процеси з апоптозом чутливих клітин імунної системи і формуванням імунодефіциту [6]. Впливи помірної інтенсивності вивчені значно менше [7]. Дані про зміни в імунній системі при дії несильних подразників обмежені. При експозиції щурів при 4°C значно підвищувався рівень АКГГ, адреналіна, ангіотензину-II і IL-10. Також спостерігали зниження кількості CD4+CD25+Foxp3+Treg-лімфоцитів [8]. Між тим, із клінічних спостережень відомо, що неконтрольовані по силі, тривалості і кратності холодкові стреси можуть сприяти виникненню опортуністичних інфекцій і обтяжувати перебіг хронічних захворювань [9].

**Мета роботи.** Вивчення впливу одноразового відтворення помірного холодowego стресу на перерозподіл клітин в межах імунної системи.

### Методика

Експерименти проведено на самцях мишей лінії C57BL віком 6-8 тижнів і масою 18-20 г з розплідника Інституту патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, які знаходились у стандартних умовах віварію. Усі експерименти проводили з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). Під час проведення експерименту усі тварини отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води.

Гострий холододовий стрес індукували витриманням мишей при +4°C протягом 15 хв. Сформовано три експериментальних групи тварин: I – контрольна (n=28), II – миші через 4 год після 15-хвилинного холодowego стресу (n=7), III – миші через 24 год після

15-хвилинного холодowego стресу (n=7). Активність стресової реакції контролювали за розвитком через 24 год гіпотрофії тимуса і лейкоцитоза.

Через 4 та 24 год досліджували показники кісткового мозку, тимуса і селезінки, фази клітинного циклу і активність апоптозу, а також гематологічні показники, включаючи лейкоцитарну формулу і вміст ретикулоцитів у крові. Для визначення фаз клітинного циклу та апоптозу суспензію клітин забарвлювали розчином йодиду пропідію з додаванням цитрату натрію. Клітини аналізували методом проточної цитометрії. Для встановлення розподілу клітин за фазами клітинного циклу аналізували гістограми, на яких оцінювали частку клітин в області, що відповідає гіпердиплоїдному набору хромосом. На гістограмі клітин, забарвлених пропідію йодидом, цим клітинам відповідає пік, що знаходиться справа від основного диплоїдного піку. При використанні спеціально розробленої програми (ModFit LT) вдається більш детально проаналізувати цю область і розрахувати частку клітин, що знаходяться в різних стадіях циклу.

Для оцінки апоптозу на цитограмі за прямим і бічним світлорозсіюванням визначали локалізацію лімфоцитів і оцінювали червону флуоресценцію йодиду пропідіюму для 10000 клітин, серед яких розраховували відсоток гіподиплоїдних клітин [10].

Отримані результати були оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програми Excell (MS Office XP). Для кількісних ознак розраховували середнє значення (M) та стандартну похибку середнього значення ( $\pm m$ ). Використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U) для виявлення достовірності відмінностей. У разі статистичного оцінювання значення  $p < 0,05$  вважали вірогідними.

### Результати та їх обговорення

В результаті розвитку помірної стресової реакції через 24 год у мишей спостерігався доволі високий лейкоцитоз, що формувався, мабуть, одночасним, хоч і недостовірним, збільшенням у крові кількості гранулоцитів і лімфоцитів (рис. 1). Одночас-

но відбувалося суттєве зниження клітинності кісткового мозку (рис. 2, а), що дозволяє припустити частково кісткомозкове походження лейкоцитозу. Не виключено також, що зниження кількості клітин у кістковому мозку може бути і результатом токсичного метаболічного впливу. Кістковий мозок містить клітини-попередники, що мігрують у тимус і розвиваються в його мікрооточенні, а частина зрілих тимоци-

тів після диференціювання повертається у кістковий мозок [11]. Введення глюкокортикоїдів сприяє міграції Т-клітин у кістковий мозок, а в селезінці кількість цих клітин знижується [12]. Нейтрофіли є ключовим компонентом уродженого імунітеру і основним джерелом запалення [13], а найважливішим регулятором вивільнення нейтрофілів із кісткового мозку в нормі і при стресі являється CXCR4 [14].

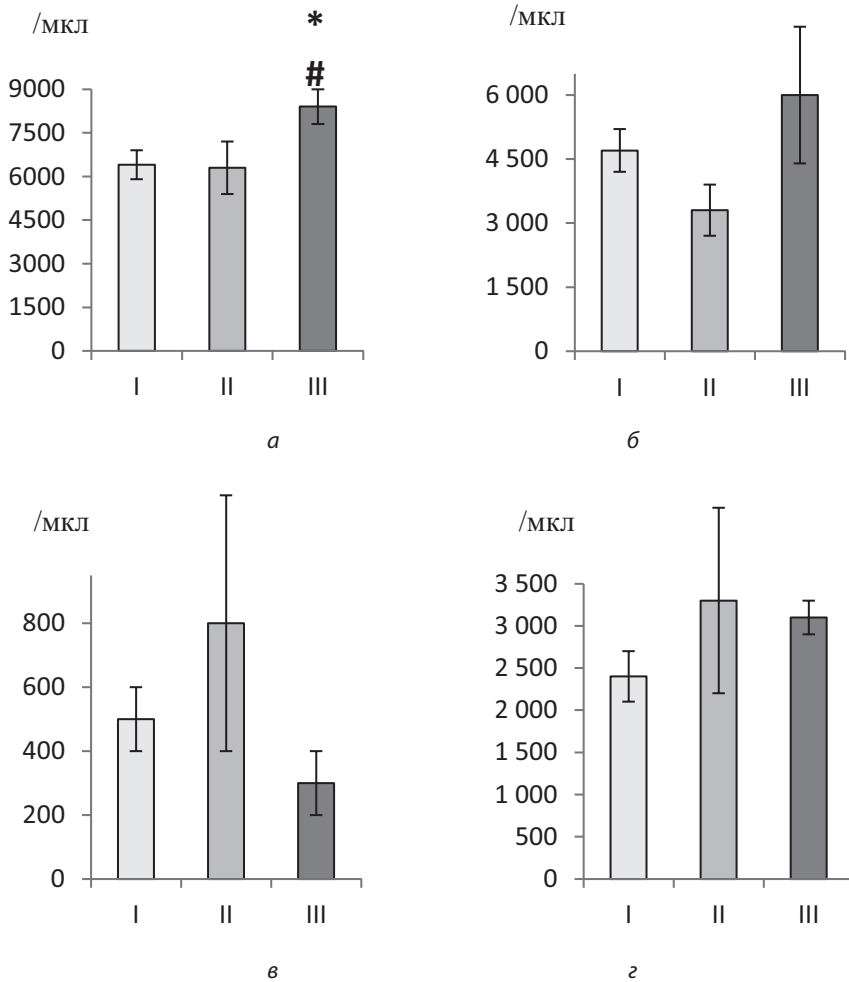


Рис 1. Кількість лейкоцитів (а), лімфоцитів (б), моноцитів (в) і гранулоцитів (г) в периферичній крові стресованих мишей: I – контрольні тварини, II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холодного стресу, III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холодного стресу. \*  $p < 0,05$  порівняно з групою контрольних мишей; #  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей через 4 год після 15-хвилинного холодного стресу

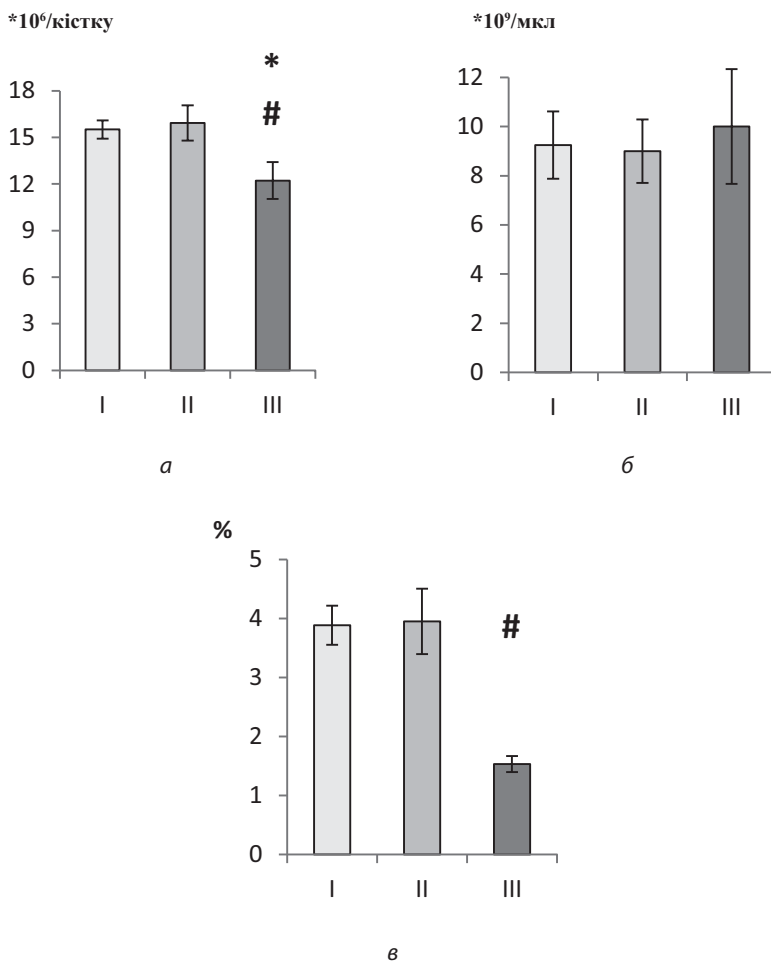


Рис 2. Клітинність кісткового мозку (а), кількість еритроцитів (б) та ретикулоцитів (в) стресованих мишей: I – контрольні тварини, II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу, III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холодового стресу. \*  $p < 0,05$  порівняно з групою контрольних мишей; #  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу

Між тим, рівень еритроцитів у зазначений термін змінювався мало. Але значно зменшувалась чисельність ретикулоцитів (рис. 2, в), що означає пригнічення еритроцитарного росту кровотворення, і що можна розглядати як підтвердження наявності токсичного впливу метаболітів на кістковий мозок.

Поповнення кількості лімфоцитів і гранулоцитів у крові може здійснюватись не тільки в результаті кісткомозкової мобілізації клітин, а також за рахунок їх міграції із тимуса і селезінки, про що свідчить значне зниження клітинності зазначених органів через 4 і 24 год від початку реакції (рис. 3, 4).

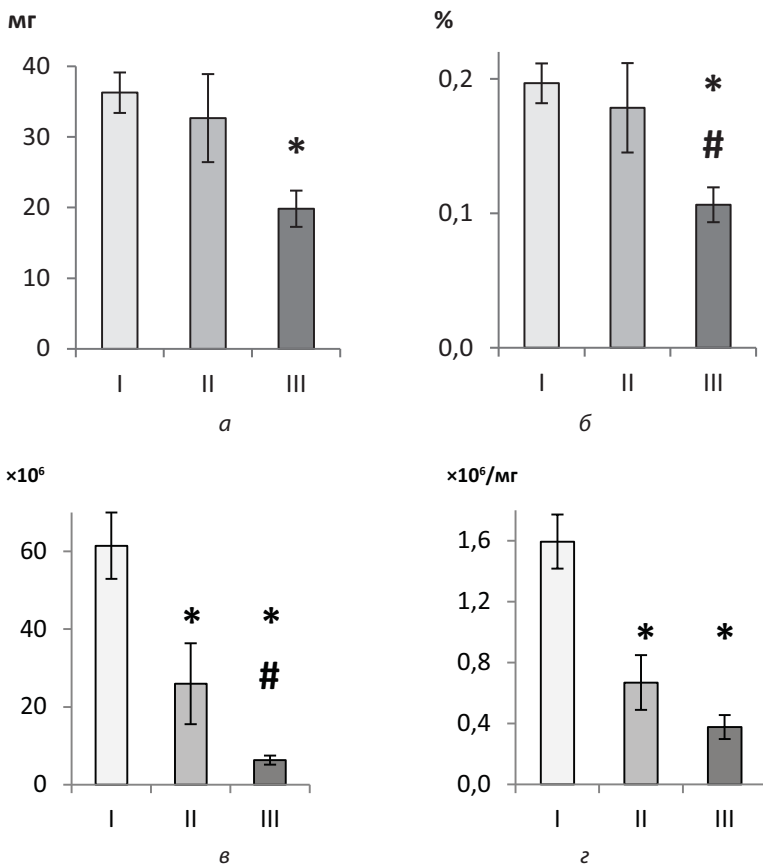


Рис 3. Показники тимуса стресованих мишей. а – маса тимуса; б – тимусний індекс; в – кількість тимоцитів на орган; г – клітинність тимуса: I – контрольні тварини; II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холододового стресу; III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холододового стресу. \*  $p < 0,05$  порівняно з групою контрольних мишей; #  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей через 4 год після 15-хвилинного холододового стресу

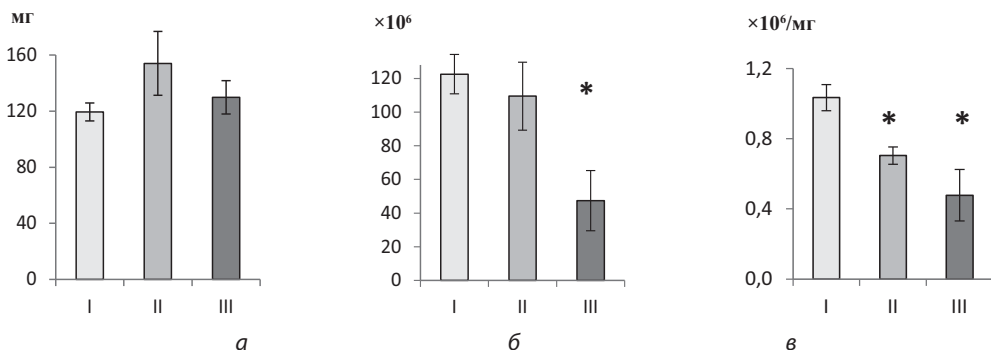


Рис 4. Показники селезінки стресованих мишей. а – маса селезінки; б – кількість спленоцитів; в – клітинність селезінки: I – контрольні тварини, II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холододового стресу, III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холододового стресу. \*  $p < 0,05$  порівняно з групою контрольних мишей

Через 24 год від початку реакції суттєво зростала кількість тимоцитів у фазі клітинного циклу G0/G1 і значно знижувалась кіль-

кість тимоцитів у клітинних фазах S і G2-M+S, що свідчить про суттєве зниження темпу проліферації клітин у тимусі (рис. 5).

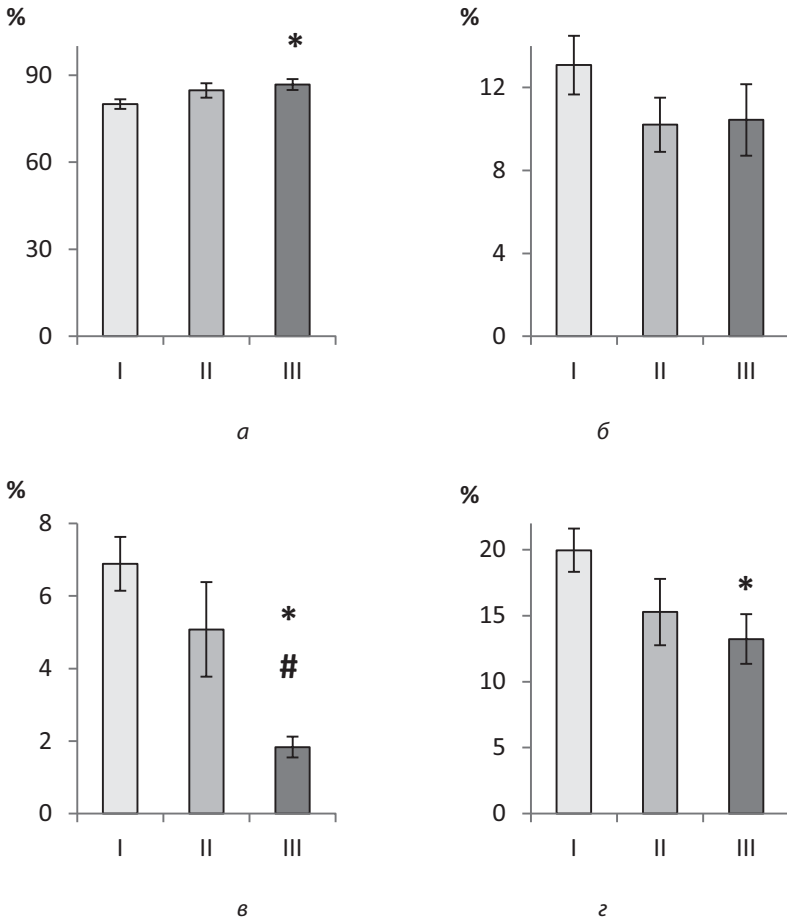


Рис 5. Розподіл по фазах клітинного циклу тимоцитів стресованих мишей. а – G0/G1; б – G2/M; в – S; г – G2-M+S; I – контрольні тварини; II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу; III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холодового стресу.

\*  $p < 0,05$  порівняно з групою контрольних мишей; #  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу

В селезінці суттєво зменшувалась кількість клітин в фазі G2/M і тільки через 4 год (рис. б), що мабуть відображає менший антипроліферативний вплив гормональних стресових механізмів на спленоцити.

Кількість клітин в різних фазах клітинного циклу у дослідженні термінів в кіст-

ковому мозку змінювалась незначно (рис. 7), що свідчить про те, що зменшення кількості клітин кісткового мозку на 24 год може не залежати від змін проліферативної активності (див. рис. 2).

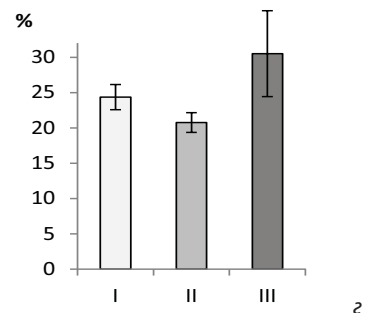
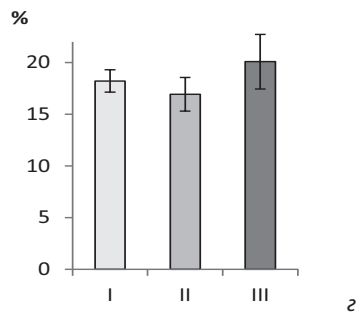
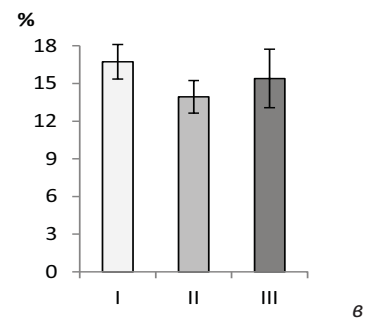
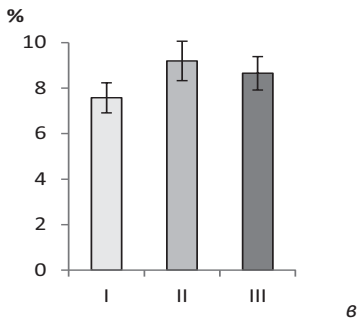
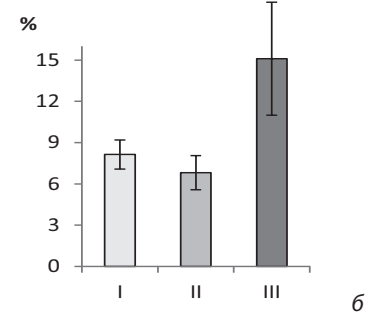
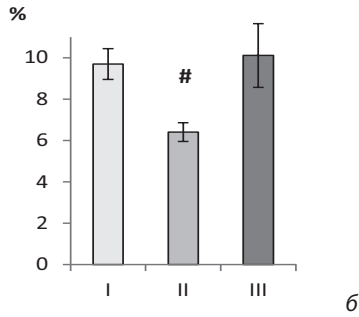
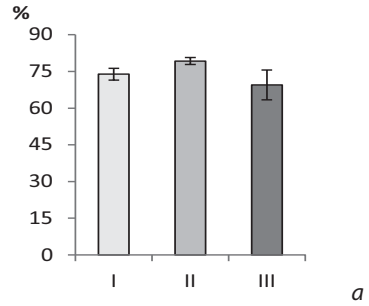
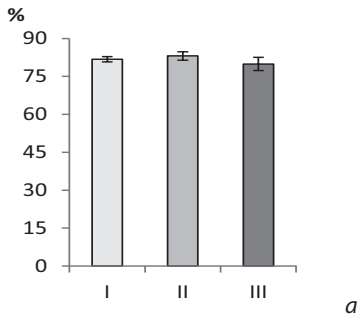


Рис 6. Розподіл по фазах клітинного циклу спленоцитів стресованих мишей. а – G0/G1; б – G2/M; в – S; г – G2-M+S: I – контрольні тварини; II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу; III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холодового стресу. #  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу

Рис 7. Розподіл по фазах клітинного циклу кісткового мозку стресованих мишей. а – G0/G1; б – G2/M; в – S; г – G2-M+S. I – контрольні тварини; II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холодового стресу; III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холодового стресу

У перерозподілі клітин велике значення можуть мати апоптотичні процеси. Найбільше зростання апоптотичних процесів спостерігалось через 24 год в тимусі (рис. 8, а), що співпадає з даними про суттєве зниження кількості тимоцитів у цей час у проліферативній фазі (див. рис. 5). Приблизно на однаковому рівні знаходились показники спонтанного апоптозу клітин кісткового мозку, але з вираженою тенденцією до під-

вищення через 24 год. В селезінці апоптоз клітин через 24 год від початку стресу був значно вище за нормальний рівень (див. рис. 8). Апоптоз лімфоцитів викликають глюкокортикоїди, він блокується антагоністами глюкокортикоїдних рецепторів [15]. Підвищення рівня апоптозу лімфоцитів відбувається також і при короткочасному холоддовому стресі у людини [16].

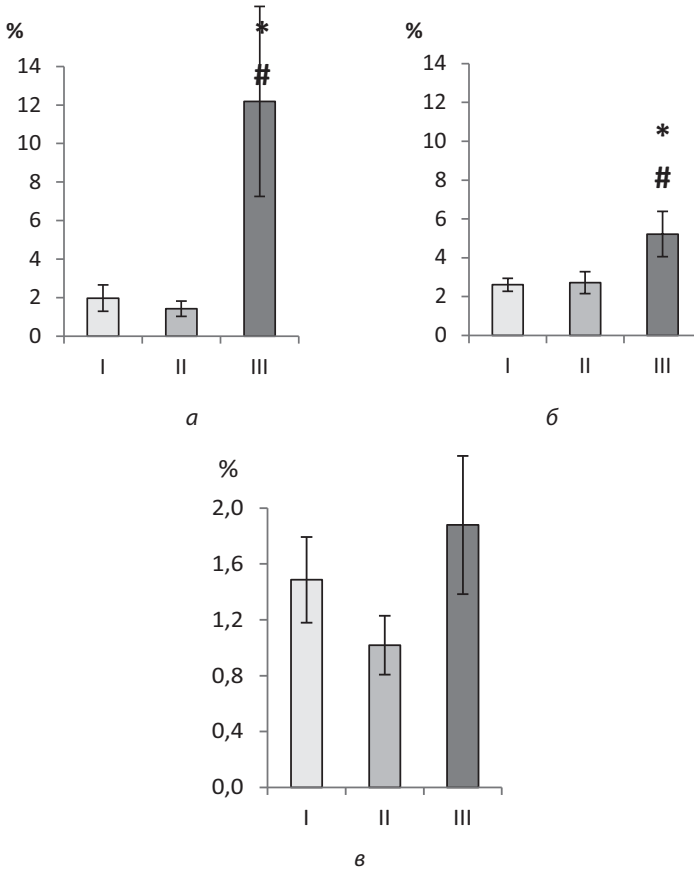


Рис 8. Спонтанний апоптоз тимоцитів (а), спленоцитів (б) і клітин кісткового мозку (в) стресованих мишей: I – контрольні тварини; II – тварини через 4 год після 15-хвилинного холоддового стресу; III – тварини через 24 год після 15-хвилинного холоддового стресу.

\*  $p < 0,05$  порівняно з групою контрольних мишей; #  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей через 4 год після 15-хвилинного холоддового стресу

Таким чином, встановлено, що в результаті відтворення помірного холоддового стресу у мишей відбувається перерозподіл клітин в імунній системі з підвищенням їх кількості у периферичній крові, зниженням вмісту в кіст-

ковому мозку, тимусі і селезінці, пригніченням проліферативної активності клітин, особливо тимоцитів, і значним зростанням апоптотичних клітин в тимусі і селезінці. Розвивається також виражена ретикулоцитопенія.



## Висновки

1. Короткочасний помірний холодовий стрес характеризується розвитком через 24 год лейкоцитозу, ретикулоцитопенії, вираженим зменшенням клітинних показників в кістковому мозку, тимусі і селезінці, суттєвим зниженням кількості тимоцитів у S і G2-M+S фазах і значним збільшенням кількості тимоцитів і спленоцитів в апоптозі, що можна розцінювати як інтенсивний клітинний стресовий перерозподіл.

2. У розвитку холодового стресу приймає участь кістковомозкова клітинна

мобілізація, міграція лімфоцитів і гранулоцитів із тимуса і селезінки, пригнічення проліферативної активності і підвищення апоптозу клітин тимуса і селезінки, що свідчить про сполучення при холодovому стресі катаболічних і регуляторних процесів в органах імунної системи.

3. Отримані дані про особливості холодової стресової реакції можуть бути використані на шляхах пошуку нових методів корекції небажаних для функціонування імунної системи стресових ефектів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Rosenne E. In vivo suppression of NK cell cytotoxicity by stress and surgery: glucocorticoids have a minor role compared to catecholamines and prostaglandins // E.Rosenne, L.Sorski, L.Shaashua, et al. // *Brain Behav Immun.* – 2014. – Vol.37. – P. 207–219.
2. Ernström U. Effects of adrenergic alpha- and beta-receptor stimulation on the release of lymphocytes and granulocytes from the spleen / U.Ernström, G.Sandberg // *Scand J Haematol.* – 1973. – Vol.11, N 4. – P. 275–286.
3. Zieziulewicz T.J. Stress-induced effects, which inhibit host defenses, alter leukocyte trafficking / T.J.Zieziulewicz, T.K.Mondal, D.Gao, D.A.Lawrence // *Cell Stress Chaperones.* – 2013. – Vol.18, N 3. – P. 279–291.
4. Роль сигнальных молекул в регуляції гранулоцитопоза при стрессиндуцирующем воздействии / В.В.Жданов, Л.А.Мирошниченко, Е.В.Удут и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2018. – Т.166, № 9. – С.315–319.
5. Bowers S.L. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice / S.L.Bowers, S.D.Bilbo, F.S.Dhabhar, R.J.Nelson // *Brain Behav Immun.* – 2008. – Vol.22, N 1. – P. 105–113.
6. Гейн С.В. Иммуномодулирующие эффекты холодового стресса / С.В.Гейн, И.Л.Шаравьева // *Успехи современной биологии.* – 2018. – Т.138, № 3. – С.243–250.
7. Messmer M.N. Mild cold-stress depresses immune responses: Implications for cancer models involving laboratory mice / M.N.Messmer, K.M.Kokolus, J.W.Eng, et al. // *Bioessays.* – 2014. – Vol.36, N 9. – P. 884–891.
8. Hu G.Z. Effect of cold stress on immunity in rats / G.Z.Hu, S.J.Yang, W.X.Hu, et al. // *Exp Ther Med.* – 2016. – Vol.11, N 1. – p. 33–42.
9. Castellani J.W. Cold Stress Effects on Exposure Tolerance and Exercise Performance / J.W.Castellani, M.J.Tipton // *Compr Physiol.* – 2015. – Vol.6, N 1. – P. 443–469.
10. Хаитов Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей / Р.М.Хаитов, Б.В.Пинегин, А.А.Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. – 352 с.
11. Boehm T. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment / T.Boehm, C.C.Bleul // *Trends Immunol.* – 2006. – Vol.27, N 10. – P. 477–484.
12. Чеботарев В.Ф. Эндокринная регуляция иммуногенеза / В.Ф.Чеботарев. – Киев, Здоров'я, 1979. – 160 с.
13. Link DC. Neutrophil homeostasis: a new role for stromal cell-derived factor-1 / D.C.Link // *Immunol Res.* – 2005. – Vol.32, N 1-3. – P. 169–178.
14. Eash K.J. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions / K.J.Eash, J.M.Means, D.W.White, D.C.Link // *Blood.* – 2009. – Vol.113, N 19. – P. 4711–4719.
15. Wolff N.C. REDD1/DDIT4-independent mTORC1 inhibition and apoptosis by glucocorticoids in thymocytes / N.C.Wolff, R.M.McKay, J.Brugarolas // *Mol Cancer Res.* – 2014. – Vol.12 N 6. – P. 867–877.
16. Ставинская О.Л. Изменение активности апоптоза лимфоцитов при кратковременном общем охлаждении человека. взаимосвязь с уровнем иммунного фона / О.Л.Ставинская. // *Вестник Уральской медицинской академической науки.* – 2018. – Т.15, № 2. – С.309–315.