

УДК 619:612.1+599.22

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.2.148

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА И ЕГО КОРРЕКЦИИ НА ЛИМФОЦИТОПОЭЗ У КРЫС

Фёдорова А.О.¹ - к.б.н., доц. каф. патологии, морфологии и физиологии, Кухаренко Н.С.¹ - д.в.н., проф. каф. патологии, морфологии и физиологии, В.А. Коноплев² - асс. кафедры клинической диагностики, к.в.н. Ковалёв С.П.² - д.в.н., проф., зав. каф. клинической диагностики. 1 — ФГБОУ ВО Дальневосточный ГАУ, 2- ФГБОУ ВО СПбГАВМ

Ключевые слова: Стресс, красный костный мозг, лимфоциты, пробиотический препарат, нейролептик, крысы. **Keywords:** Stress, red bone marrow, lymphocytes, probiotic drug, neuroleptic, rats.



РЕФЕРАТ

При длительном воздействии различных стресс-факторов в организме животных возникает стрессовый иммунодефицит. На ранней стадии стресса в кровь интенсивно поступают катехоламины способствующие выработке гликогенолиза и быстрой мобилизации энергоресурсов с одновременной выработкой кортикостероидов подавляющих активность Т-лимфоцитов. При хроническом стрессе нарушенные функциональные и метаболические факторы не успевают нормализоваться из-за активной секреции катехоламинов и кортикостероидов, на этом фоне уменьшается количество всех субпопуляций Т-лимфоцитов и соответственно снижается их функциональная активность, в следствие чего возникают вторичные иммунодефициты сопровождающиеся развитием патологических процессов хронического характера. В качестве профилактики развития стресса животным применяют различные фармакологические вещества из которых более широкое применение находят препараты группы адаптогенов повышающих сопротивляемость организма к различным неблагоприятным воздействиям, независимо от их происхождения. Цель работы – изучить реакцию лимфоцитарного ростка кроветворения на воздействие холодового стресса и его коррекцию пробиотическим препаратом «Интестевит» и нейролептиком «Аминазин». Материалом для исследований явились клинически здоровые беспородные белые крысы (самки) отобранные по методу пар-аналогов в возрасте 11-12 месяцев, содержащиеся в одинаковых условиях с соблюдением адекватного питания, температурных факторов, освещённости, влажности помещения. В результате выявлено, что при использовании пробиотического препарата «Интестевит» при остром стрессе из костного мозга наблюдается активный выброс лимфоцитов, с последующей активизацией лимфоцитарной функции на 11,9% при длительном стрессе для дальнейшего иммунного ответа. Применении нейролептика «Аминазин» в период острого стресса в костном мозге приводит к увеличению количества лимфоцитов с последующим его снижением указывающим на более слабый иммунный ответ. У животных, не получавших препараты, при остром стрессе так же активность лимфоцитопоэза увеличивается, с последующим его снижением при длительном стрессе.

ВВЕДЕНИЕ

Поддержку постоянства нормальной жизнедеятельности и резистентности в организме животных обеспечивает единая нейроэндокринно-иммунная система, на которую оказывают активное воздействие различных неблагоприятных факторов к числу, которых относится стресс. При длительном воздействии различных стресс-факторов (физических, в том числе транспортировка и холод, химических, биологических, психоэмоциональных и др.) возникает стрессовый иммунодифицит [10]. Механизм развития стресса не зависит от его причины, но реакция на стресс носит индивидуальный характер и зависит от длительности его воздействия [4, 11]. Известно, что стресс-реакция любого организма протекает в несколько стадий (тревоги, адаптации, истощения). Учеными занимающимися исследованиями в данной области [8,16] выявлено, что на ранней стадии стресса происходит интенсивное поступление в кровь катехоламинов способствующих выработке гликогенолиза и быстрой мобилизации энергоресурсов; одновременно с этим вырабатываются кортикостероиды подавляющие активность Т-лимфоцитов, оказывая иммуностимулирующий эффект. На более поздних стадиях воздействия стресс-фактора активно вырабатываются глюкокортикоиды, стимулирующие образование углеводов для энергетических целей. При хроническом стрессе нарушенные функциональные и метаболические факторы не успевают нормализоваться из-за активной секреции катехоламинов и кортикостероидов, на этом фоне уменьшается количество всех субпопуляций Т-лимфоцитов и соответственно снижается их функциональная активность. В организме таких животных создаются условия для возникновения вторичных иммунодефицитов, сопровождающихся развитием патологических процессов хронического характера.

В качестве профилактики развития стресса животным применяют различные фармакологические препараты, в число которых входят нейролептики, антиде-

прессанты, адаптогены. Для понижения возбудимости животных, применяют нейролептики к числу которых относится аминазин, указанный в ветеринарно-санитарных правилах по перевозке животных [6]. Данный препарат не может полноценно уберечь животное от развития стресс-реакции при длительном транспортном стрессе, а в некоторых случаях он может быть причиной дистрофических изменений в нервных клетках головного мозга и нарушениях функции центральной нервной системы. В современное время в качестве альтернативы транквилизаторам при стрессах все более широкое применение находят препараты группы адаптогенов повышающих сопротивляемость организма к различным неблагоприятным воздействиям, независимо от их происхождения [3, 7, 9, 20]. К группе адаптогенов так же относятся и пробиотические препараты, используемые для профилактики и лечения смешанных желудочно-кишечных инфекций, при нарушении работы желудочно-кишечного тракта на фоне нарушения режимов кормления, технологических стрессах и других причин, а так же для стимуляции неспецифического иммунитета [2, 13].

Цель работы – изучить реакцию лимфоцитарного роста кроветворения на воздействие холодового стресса и его коррекцию пробиотическим препаратом «Интестевит» и нейролептиком «Аминазин».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований явились беспородные белые крысы (самки) отобранные по методу пар-аналогов в возрасте 11-12 месяцев, клинически здоровые, содержащиеся в одинаковых условиях вивария, с соблюдением адекватного кормления, температурных факторов, освещённости, влажности помещения. Три группы крыс (по 9 животных в каждой) в течение 8 суток помещали в морозильную камеру бытового холодильника марки «STINOL» при температуре от минус 130С до минус 150С на 3 часа. Для контроля были отобраны 9 крыс по (4 контрольная группа) тем же параметрам,

что и экспериментальные животные.

В первой опытной группе за 10 дней до начала опыта крысам скармливали в дозе 0,2 гр. пробиотический препарат «Интестевит». Пробиотик смешивали с небольшим количеством плавленого сыра в виде кусочков массой 0,4-0,5 гр., скармливали 1 раз день в утреннее кормление.

Животным второй опытной группы за 12 часов до начала эксперимента и непосредственно перед воздействием стресса внутримышечно в дозе 1 мг/кг массы животного вводили нейролептический препарат «Аминазин». Дозу препарата «Аминазин» применяли в соответствии с «Ветеринарно-санитарными правилами перевозки животных, птицы, рыбы, продуктов и сырья животного происхождения автомобильным транспортом» №432-5, утвержденными начальником главного управления ветеринарии Госагропрома СССР 30 января 1986 г Л.П. Малининым [6].

Животных третьей опытной группы подвергали холодовому стрессу без введения каких-либо препаратов. Схема опыта представлена в таблице 1.

Убой животных проводили на 1, 3 и 8 сутки от начала эксперимента. Мазки готовили из костного мозга грудной кости, окрашивали по Майн-Грюнвальду и по Гимза, микроскопировали в цифровом монокулярном микроскопе марки Levenhuk при увеличении *40-1600, окуляр 10, объектив 40. Математическую обработку

полученных цифровых результатов проводили с помощью компьютерной программы статистики «Primer of Biostatistics».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакция лимфоцитарного ростка кроветворения на воздействие холодового стресса и его коррекцию пробиотическим препаратом «Интестевит» и нейролептиком «Аминазин» представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

В первый день воздействия стресс-фактора (острый стресс) у животных, получавших пробиотический препарат «Интестевит» выявлено снижение количества клеток лимфоцитопоза на 7,6% ($P < 0,001$) от границы показателей контрольной группы животных. У крыс, которым применяли нейролептик «Аминазин» отмечено увеличение количества клеток лимфоцитопоза на 1,7% ($P < 0,01$), тогда как в третьей опытной группе увеличение данного показателя было на 3,2% ($P < 0,001$).

На третий день воздействия стресс-фактором (рис. 1) у крыс, получавших пробиотический препарат «Интестевит», обнаружено увеличение количественного состава лимфоцитопоза на (5,0%) ($P < 0,001$) от показателей контрольной группы животных. У животных второй и третьей опытных групп так же наблюдалось увеличение данного показателя со-

Таблица 1

Схема опыта

Группы	Схема опыта
Опытная группа 1 (O_1)	Холодовой стресс 3 часа ежедневно в течение 8 суток. Пробиотический препарат «Интестевит» 0,2 г на 1 голову с кормом ежедневно в течение 10 дней до стресса и непосредственно в день перед стрессом.
Опытная группа 2 (O_2)	Холодовой стресс 3 часа ежедневно в течение 8 суток. Аминазин 2,5% р-р двукратно – 1 мг/кг в/м за 12 часов до стресса и непосредственно перед стрессированием.
Опытная группа 3 (O_3)	Холодовой стресс 3 часа ежедневно в течение 8 суток.
Контрольная группа (К)	Без воздействия стресса и какими-либо препаратами

Таблица 2

Реакция лимфоцитопозза крыс на холодовой стресс и его коррекцию, n=27;
M±m; %

Дни эксперимента	Группы			
	К	«O ₁ »	«O ₂ »	«O ₃ »
Первый день	16,3±0,14	8,7±0,01***	18,0±0,04**	20,0±0,08**
Третий день		21,3±0,12***	20,7±0,02***	19,2±0,12**
Восьмой день		28,7±0,10***	16,7±0,14	16,9±0,10*

Примечание: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

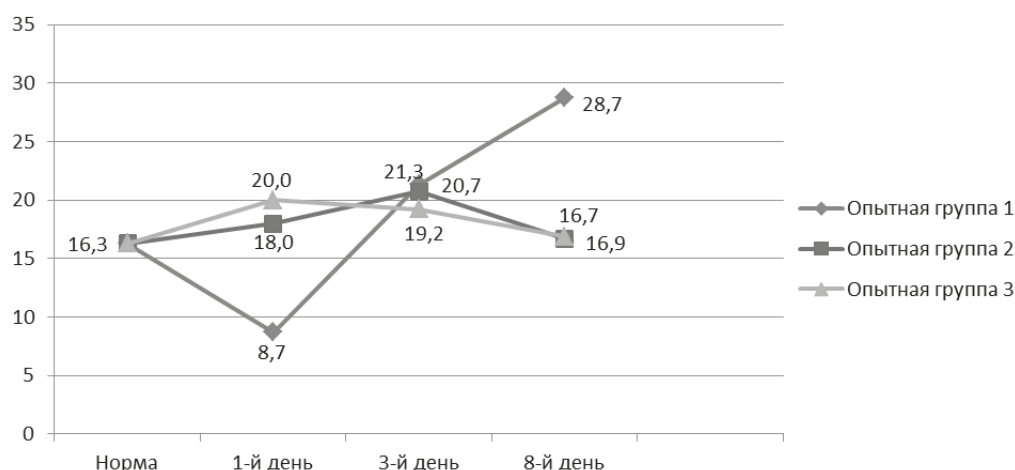


Рис. 1 Динамика реакции лимфоцитарного ростка кроветворения при стрессе и его коррекции, %.

ответственно на 4,4 и 2,9% ($P < 0,001$ и $P < 0,01$) от границы показателей контрольной группы животных.

На восьмой день воздействия стресс-фактора (длительный стресс) у животных второй и третьей опытных групп наблюдалось снижение количества клеток лимфоцитарного ростка до пределов показателей контрольной группы животных. У крыс получавших пробиотический препарат «Интестевит» обнаружено увеличение количественного состава лимфоцитарного ростка кроветворения на 12,4% ($P < 0,001$) от границы показателей крыс контрольной группы. А у животных 2 и 3

опытных групп количество клеток лимфоцитарного ростка было выше концентрации контрольных крыс соответственно на 0,4% ($P > 0,05$) и 0,6% ($P < 0,05$)

Из всех существующих видов лимфоидная ткань, является самой мощной системой имеющей свои центральные и периферические органы. Имеются работы, указывающие, что лимфоциты составляют в среднем 20% клеток красного костного мозга, из них большая часть приходится на развивающиеся и зрелые В-лимфоциты. Созревшие В-лимфоциты покидают костный мозг и заселяют В-зависимые зоны периферических органов

иммунной системы. Большая часть (75%) В-лимфоцитов, образовавшихся в костном мозгу, здесь же погибают механизмом апоптоза в процессе отбора, включающего положительную селекцию (выживание клеток с нужными рецепторами) и отрицательную селекцию (гибель клеток с рецепторами к собственным антигенам). [12, 14]. Наши исследования согласуются с мнением авторов, которые в своих работах писали, что в период острого стресса наступает быстрая мобилизация в кровотоки Т-цитотоксических лимфоцитов и В-клеток из костного мозга перераспределяющихся по разным структурам организма, избирательно накапливаясь в тканях подвергнутых агрессии стрессора, и стимулирующих иммунные реакции [15, 17]. При использовании пробиотического препарата «Интестевит» у животных в период острого стресса наблюдается активная мобилизация лимфоцитов из красного костного мозга в виде резкого снижения их количества ниже нижней границы физиологической нормы в сравнении с животными других групп, где наоборот наступала активация дальнейшей выработки лимфоидных клеток.

Известно, что при воздействии хронического стресс-фактора первоначально активируется, а в дальнейшем тормозится иммунный ответ, вследствие чего развиваются болезненные состояния с исходом в конкретную соматическую патологию, так как в этот период поступившие в кровоток иммунокомпетентные клетки возвращаются в места своей постоянной локализации, что снижает эффективность иммунного ответа в периферических органах. Длительный стресс так же приводит и к нарушению пролиферативной активности лимфоцитов [15, 19, 21, 23]. Установлено, что при хроническом стрессе подавляется иммунная функция организма за счет снижения числа и активности иммуноцитов на фоне усиленной выработки цитокинов и других биологически активных веществ [18].

На третий и восьмой дни воздействия стресс-фактора на организм крыс полу-

чавших пробиотический препарат «Интестевит», наблюдалось увеличение количества клеток лимфоцитопоза на 5,0 и 12,4%, что может указывать на стадию резистентности стресса, когда в костном мозге усиливается выработка лимфоидных клеток. У крыс во второй и третьей опытных группах при длительном стрессе на фоне незначительного увеличения активности выработки лимфоцитов (на 4,4 и 2,9%) в костном мозге наблюдалось дальнейшее снижение активности лимфоидного ростка кроветворения, что указывает на возможное развитие следующей стадии стресса - истощение. Результаты исследований, согласуются с мнением ряда авторов указывающих в своих работах, что для стадии мобилизации характерны клеточное опустошение за счет миграции лимфоцитов в периферические лимфоидные органы, а в стадию резистентности наблюдается увеличение уровня лимфоидных клеток в костном мозге, для подготовки организма к дальнейшим изменениям в системе крови и иммунного ответа на раздражитель [21, 22, 25]. При истощении большую роль играет опустошение клеточных депо и выход в кровяное русло незрелых форм иммунных клеток, которые не могут полноценно ответить на длительный стресс и в результате могут возникнуть тяжелые соматические заболевания, напрямую связанные с состоянием иммунитета [5]

ВЫВОДЫ

При использовании пробиотического препарата «Интестевит» в период острого стресса из костного мозга наблюдается активный выброс лимфоцитов (снижение их количества на 8,1%), тогда как при длительном стрессе активизируется лимфоцитарная функция костного мозга на 11,9% для дальнейшего иммунного ответа.

При применении нейролептика «Аминазин» в период острого стресса наблюдается увеличение количества лимфоцитов на 1,2%, а при длительном стрессе увеличением на 3,9% с последующим его снижением на 4%, что указывает на более слабый иммунный ответ.

У животных не получавших препараты при остром стрессе активность лимфоцитопоза увеличивается на 3,2%, с последующим снижением его активности при длительном стрессе на 0,8 и 3,3% в сравнении с первым днем.

The impact of stress and its correction on lymphocytopoiesis in rats. A. O. Fedorova, associate professor of the department of pathology, morphology and physiology, candidate of biological sciences, N. S. Kukharensky, professor of the department of pathology, morphology and physiology, doctor of veterinary sciences, professor, FSBEI HE «Far Eastern State Agrarian University», Blagoveshchensk Russia, V. A. Konoplev assistant of the department of clinical diagnostics, candidate

of veterinary sciences, S. P. Kovalev head of the department of clinical diagnostics, doctor of veterinary sciences, professor, FSBEI HE "Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine", Saint - Petersburg, Russia.

ABSTRACT

With prolonged exposure to various stress factors, stress immunodeficiency occurs in the body of animals. At an early stage of stress, catecholamines intensively enter the bloodstream, contributing to the production of glycogenolysis and rapid mobilization of energy resources, while simultaneously producing corticosteroids that suppress the activity of T-lymphocytes. In chronic stress, impaired functional and metabolic factors do not have time to normalize due to the active secretion of catecholamines and corticosteroids, against this background, the number of all subpopulations of T-lymphocytes decreases and, accordingly, their functional activity decreases, resulting in secondary immunodeficiency accompanied by the development of chronic pathological processes. As a prevention of the development of stress, various pharmacological substances are used in animals, of which preparations of the group of adaptogens that increase the body's resistance to various adverse effects, regardless of their origin, are more widely used. The aim of the work is to study the reaction of the lymphocytic germ of hemato-

poiesis to the effects of cold stress and its correction with the probiotic drug "Intestevit" and the neuroleptic "Aminazine". The material for the research was clinically healthy mongrel white rats (females) selected by the method of analog pairs at the age of 11-12 months, kept in the same conditions in compliance with adequate nutrition, temperature factors, light, humidity of the room. As a result, it was revealed that when using the probiotic drug "Intestevit" under acute stress, an active release of lymphocytes from the bone marrow is observed, followed by an activation of lymphocytic function by 11.9% under prolonged stress for further immune response. The use of the neuroleptic "Aminazine" during acute stress in the bone marrow leads to an increase in the number of lymphocytes, followed by a decrease indicating a weaker immune response. In animals that did not receive the drugs, the activity of lymphocytopoiesis also increases with acute stress, followed by its decrease with prolonged stress.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаптогенное стресс-корректорное действие аурила / Ю. Г. Юшков, О. А. Донченко, Н. Е. Панова, Л. И. Барыкина // Научное обеспечение АПК Сибири, Монголии, Казахстана, Беларуси и Башкортостана. - Новосибирск, 2002. - С. 498-500.
2. Антипов, В. А. Пробиотики в ветеринарии / В. А. Антипов // Новые фармакологические средства в ветеринарии. - Ленинград : 1991. - С. 7-8.
3. Бояринцев, Л. Е. Применение новых биологически активных препаратов в ветеринарии и животноводстве / Л. Е. Бояринцев, А. Г. Шахов, А. И. Ануфриев // Воронеж, 2002. - 41 с.
4. Брайт, Д. Стресс. Теории, исследования, мифы / Д. Брайт, Ф. Джонс. - Санкт-Петербург : Прайм-Еврознак, 2003. - 352 с.
5. Булгакова, О.С. Иммуитет и различные стадии стрессорного воздействия // Успехи современного естествознания. 2011. - № 4. - С. 31-35. - URL: <http://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=21148>
6. Ветеринарно-санитарные правила перевозки животных, птицы, рыбы, продуктов

- и сырья животного происхождения автомобильным транспортом: [утв. Госагропромом СССР 30.01.1986 г. № 432-5]. // Legalacts.ru «Законы, кодексы и нормативно-правовые акты в Российской Федерации»: [сайт]. 2019. – URL : <http://legalacts.ru/doc/veterinarno-sanitarnye-pravila-perevozki-zhivotnykh-ptitsy-ryby-produktov/>
7. Влияние «Пантолена» на показатели крови самцов крыс в условиях покоя и стресса. Режим доступа: <http://apifito.ru/article/vliyanie-pantolena-na-pokazateli-krovi-samtsov-krys-v-usloviyah-pokooya-i-stressa>
8. Грабовский, С.С. Влияние биологически активных веществ разного происхождения на лабораторных животных в стрессовом состоянии/ С. С. Грабовский// Научные труды SWORLD. - Т. 44, вып. 3. - Иваново: ООО Новый мир, 2013. - С. 13-16.
9. Иммунология / Е.С. Воронин, А.М. Петров, М.М. Серых, Д.А. Девришов / Под ред. Е.С. Ворониной.- Москва : Колос-Пресс, 2002.-408с
10. Иммуитет и стресс [сайт].- URL : http://media.ls.urfu.ru/imunohimiya/immunohimiya/immunnaya_sistema_i_ekologiya/immunitet_i_stress/ (дата обращения: 26.03.2021).
11. Карушева, К.Ю. Клинико-гематологические показатели собак при стрессе [Текст]/ Карушева К.Ю., Коноплев В.А., Ковалёв С.П.// Ветеринария и кормление. 2019. № 1. С. 44-46.
12. Кровь и кроветворные ткани [сайт]. – URL : <http://vmde.org/index.php> (дата обращения: 26.03.2021).
13. Кухаренко, Н.С. Реакция сельскохозяйственных животных на транспортный стресс и его коррекция с помощью пробиотиков / Н.С. Кухаренко, А.О. Фёдорова, М.Ю. Щелканов // Юг России: экология, развитие. – 2019. – Т. 14, № 2. – С. 87-98.
14. Меркулова, И. П. Патофизиология системы крови : учеб.-метод. пособие / И. П. Меркулова. – 2-е изд. – Минск: МГЭУ им. А.Д.Сахарова, 2012. – 120 с.
15. Прохоренко, И.О. Стресс и состояние иммунной системы в норме и патологии. / И.О. Прохоренко, В.Н. Германова, О.С. Сергеев // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». - 2017 г. № 1 – С. 82-90
16. Развитие стресса [сайт].- URL : <https://yogin.by/fiziologiya-stressa> (дата обращения: 26.03.2021).
17. Тендиткин, М. В. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов иммунокомпетентных органов мышцей под влиянием стресса / М. В. Тендиткин, А. В. Шурлыгина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2004. – Т. 90 - №12. - С.1522 – 1529.
18. Фёдорова, О. В. Постстрессовая модуляция органов иммуногенеза / О. В. Фёдорова, Н. Г. Краюшкина, Е. Г. Шефер [и др.] // Вестник Волгоградского медицинского университета. 2010. - №3 - С. 8-12.
19. Ben-Eliyahu, S. Can we really know if a stressor increases or decreases natural killer cell activity? / S. Ben-Eliyahu, // Brain Behav Immun. – 2012. – Vol. 26 (8). – P. 1224 –1255.
20. Chrousos, G.P. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders / G.P. Chrousos, T.Kino // Stress 2007 - №10 - P.213–219
21. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk / S. Cohen, D. Janicki-Deverts, W.J. Doyle [et al.] // Proc Nat Acad Sci USA. 2012. – Vol. 109 (16). – P. 5995–5999.
22. Dhabhar, F. S. Neuroimmunomodulation. / F. S. Dhabhar // – 2009. - June. Vol. 16(5). - P. 300-317.
23. Stress-induced redistribution of immune cells – from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones – Curt Richter Award Winner / F.S. Dhabhar, W.B. Malarkey, E. Neri, B.S. McEwen // Psychoneuroendocr. – 2012. – Vol. 37 (9). – P. 1345–1368.
24. Satoh, E., Stress. / E.Satoh, I. L. Edamatsu, Y. Omata // Stress. - 2006. - Vol. 9, № 4. - P. 223-230.