

## ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ СТРЕСОВИХ РЕАКЦІЙ НА РЕГЕНЕРУЮЧУ ІМУННУ СИСТЕМУ ПІСЛЯ ДІЇ ЦИКЛОФОСФАНУ

СЕМЕНОВА Я.-М. О., НИКОЛЬСЬКА В.В.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України», м. Київ

### ВСТУП

На сучасному етапі розвитку імунології і імунопатології з'ясовано, що важливими умовами нормального функціонування імунної системи є циркуляція, міграція і перерозподіл клітин у її межах. Фізіологічний розвиток цих процесів веде до реалізації адекватної імунної відповіді, а його відхилення від необхідного напрямку порушує міжклітинну кооперацію і може привести до пригнічення антиінфекційного захисту і виникнення аутоімунної, алергічної і онкологічної патології [1].

Між тим, експериментальні дослідження часто не дають відповіді про значення ситуації, що складається, у зв'язку з особливостями клітинного перерозподілу і можливими його наслідками для імунологічних процесів. Значною мірою непередбачені результати обумовлені багатоконпонентністю імунної системи, різнонаправленістю дії окремих її складових, а також іноді одночасним впливом на організм кількох сильних факторів. Велика увага приділяється дії на організм стресів [2-4], цитотоксичних препаратів і їх комбінації, що важливо і для практичної медицини. Саме вивчення особливостей механізму імунотропної дії комбінації метаболічно активних факторів, маючих практичне значення сьогодні, є одним із основних напрямків імунології і патофізіології [2,5].

Особливо ретельно вивчаються процеси в центральних органах імунітету: кістковому мозку і тимусі. Відомо, що майже всі клітини-попередники вродженої і адаптивної імунних систем дозрівають у «нішах» кісткового мозку [6], звідки вони виходять у циркуляцію, включаючи попередники Т-лімфоцитів, які мігрують у тимус. Далі популяції кістково-мозкових і тимусних клітин заселяють периферичні лімфоїдні органи. Це, так би мовити, «центральний логістичний тракт» імунної системи. Може скластися ситуація, коли напрямок і інтенсивність переміщення клітин в осі центральні органи-периферія пригнічується або навпаки підсилюється. Останній варіант дуже важливий для регенерації імунної системи [7] і отримав назву кістково-мозкової клітинної мобілізації, а одним із найактивніших її індукуючих факторів виявився циклофосфан (ЦФ) [8,9].

Процес кістково-мозкової клітинної мобілізації може індукуватися великою кількістю інших факторів. Але один із найбільш розповсюджених, який до того ж має велике практичне значення, залишається мало вивченим. Мова йде про стресові реакції, що індукуються різними соматично спрямованими і психогенними факторами, а одним із головних механізмів реалізації їх дії також є клітинний перерозподіл. Часто стреси супроводжують терапію ЦФ в онкології, гематології і лікуванні аутоімунних захворювань. І циклофосфан, і стреси володіють імуносупресивною дією, і в той же час активно задіяні у перерозподілі клітин імунної системи. Але до яких імунологічних зрушень призводить сполучення цих факторів, – мало досліджено.

Ефект стресового впливу визначається кількісними параметрами (інтенсивність, частота, тривалість) і якісними особливостями стресорів і характером їх впливу – періодичністю, монотонністю та інше. З іншого боку, фізіологічний стан системи організму визначає не тільки ефективність стресового впливу, але і процес адаптації до нього [10].

В роботі для вивчення кістково-мозкової клітинної мобілізації була обрана класична модель з індукцією процесу циклофосфаном (ЦФ). Це алкілююче з'єднання, що має високу токсичність по відношенню до проліферуючих клітин. Але дормантні гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) ним практично не уражуються завдяки наявності у них альдегіддегідрогенази, інактивуючої ЦФ, і АВС-транспортера. Завдяки зберіганню ГСК, деплеція кісткового мозку, яка відбувається у перші години після введення ЦФ, протягом кількох днів змінюється на активну ГСК-залежну регенерацію кісткового мозку з наступною вираженою кістково-мозковою мобілізацією і виходом у циркуляцію великої кількості кістково-мозкових клітин, особливо нейтрофілів і ГСК. Нейтрофіли виконують дуже важливу роль провідників, які своїми ферментативними механізмами полегшують міграцію ГСК із кісткового мозку.

Для дослідження сумісного впливу на кістково-мозкову клітинну мобілізацію і імунну систему стресових реакцій і ЦФ використовували класичну модель – холодний стрес у двох ва-

ріантах: гострий стрес і пролонгований (іноді визначається як хронічний або повторювальний), оскільки за даними літератури механізм розвитку гострого і пролонгованого стресів може суттєво розрізнятися. Відомо, що гострий стрес може позитивно впливати на імунну систему, а хронічний може призвести до відхилення здоров'я від норми. Так, відомо, що холодний стрес може сильно знизити ефективність цитостатиків і протипухлинного імунітету [11, 12].

Відповідно метою роботи було вивчення впливу гострого та пролонгованого стресів на індуковану ЦФ кістково-мозкову мобілізацію і стан 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.

На рис. 1 представлена схема експерименту. Було сформовано шість експериментальних груп тварин: I – контрольні нормальні

тварини (n=10), II – миші, яким відтворювали гострий 15-хвилинний стрес при +4°C (n=10), III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес, а саме витримували протягом 15 хвилин при t +4°C чотири рази з інтервалом у 24 години (n=9), IV – миші, яким внутрішньочеревно вводили ЦФ в дозі 200 мг/кг (n=7). Мишам V та VI груп внутрішньочеревно вводили водний розчин циклофосфану. На 7 день після введення ЦФ мишам V групи відтворювали гострий холодний стрес (n=7). Мишей VI групи для отримання пролонгованого стресу, починаючи з 4 дня після введення ЦФ, витримували протягом 15 хвилин при t +4°C чотири рази з інтервалом у 24 години (n=8). В день відтворення гострого стресу і в день останнього витримування на холоді при пролонгованому стресі через 2 години після дії подразнюючого фактора мишей всіх груп імунізували внутрішньочеревним введенням суспензії еритроцитів барана (10<sup>8</sup>), через 4 доби проводили повторну ін'єкцію аналогічної кількості клітин у подушечку задньої лапи. За зазначеною схемою імунізували і контрольних мишей. Ще через добу після ефірної евтаназії тварин шляхом цервікальної дислокації оцінювали антитільну імунну відповідь, вираженість реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) та загальний стан органів імунної системи. Таким чином, дослідження імунної системи тварин усіх груп проводили через 12 діб після введення циклофосфану, протягом яких у тварин наростали ГСК-залежні процеси регенерації імунної системи.

Дні/ групи	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I								↑				↑	↓
II								↑↑				↑	↓
III					↑	↑	↑	↑↑				↑	↓
IV	↑							↑				↑	↓
V	↑							↑↑				↑	↓
VI	↑				↑	↑	↑	↑↑				↑	↓
	ЦФ				Стрес	Стрес	Стрес	Стрес/ ЕБ				ЕБ	Облік

Рис. 1. Схема експериментальної моделі гемоімунодефіциту

Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали пролонгований стрес. ЦФ – циклофосфан, ЕБ – еритроцити барана.

Визначали абсолютну і відносну масу тимуса і селезінки, кількість тимоцитів і спленоцитів, клітинність (кількість клітин в 1 мг органу) тимуса і селезінки, кількість клітин кісткового мозку та лімфатичних вузлів брижі. Кількість лейкоцитів, лімфоцитів, гранулоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, гематокрит, концентрацію гемоглобіну в периферичній крові визначали на автоматичному гематологічному аналізаторі PARTICLE COUNTER (модель PCE-210) (ERMA INC, Японія). Поглинальну активність перитонеальних макрофагів відносно ФІТЦ-міченого стафілокока досліджували на проточному цитофлуориметрі [13]. Вивчення проліферативної активності Т-лімфоцитів і цитотоксичної активності природних кілерних лімфоцитів здійснювали за МТТ-методом [14]. Визначення кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці проводили методом локального гемолізу в гелі, оцінювали вміст геаглютининів та гемолізину в сироватці крові. Реакцію гіперчутливості сповільненого типу оцінювали різницею маси дослідних та контрольних фрагментів кінцівок [15].

Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програм Excell (MS Office XP) та Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Для виявлення відмінностей між досліджуваними групами використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U). Дані представлені у вигляді медіани (Median) з нижнім і верхнім

квартілями (25%-75%). При інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Відтворення гострого і пролонгованого стресів у нормальних мишей сприяло зниженню у тварин маси тіла (рис. 2А), що свідчить про виражену катаболічну активність реакції за даних умов їх індукції. Катаболічний ефект стресу веде до дезінтеграції білків у м'язовій, сполучній і лімфатичній тканинах і викликає інволюцію тимуса. Продукти розпаду тканин використовуються в системах, які відповідальні за адаптацію. Катаболічні процеси сприяють розвитку гомеостатичних пристосувальних механізмів, у тому числі і підсиленню міграції лімфоїдних клітин у кістковий мозок з наступною активацією гемопоезу [10]. При цьому у тварин з гострим стресом, на відміну від мишей з пролонгованим стресом, можна було спостерігати зниження маси тимуса (рис. 2Б), відносної маси тимуса (рис. 2В) і кількості тимоцитів (рис. 2Г), мабуть, за рахунок апоптичної дії стресових факторів і порушення міграції у тимус кістково-мозкових попередників [16], зниження кількості клітин лімфатичних вузлів брижі в S-фазі (рис. 5В) і тромбоцитоз (рис. 7А). Показники селезінки: маса (рис. 3А), відносна маса (рис. 3Б) і кількість спленоцитів (рис. 3В) знижувалися при обох видах стресу.

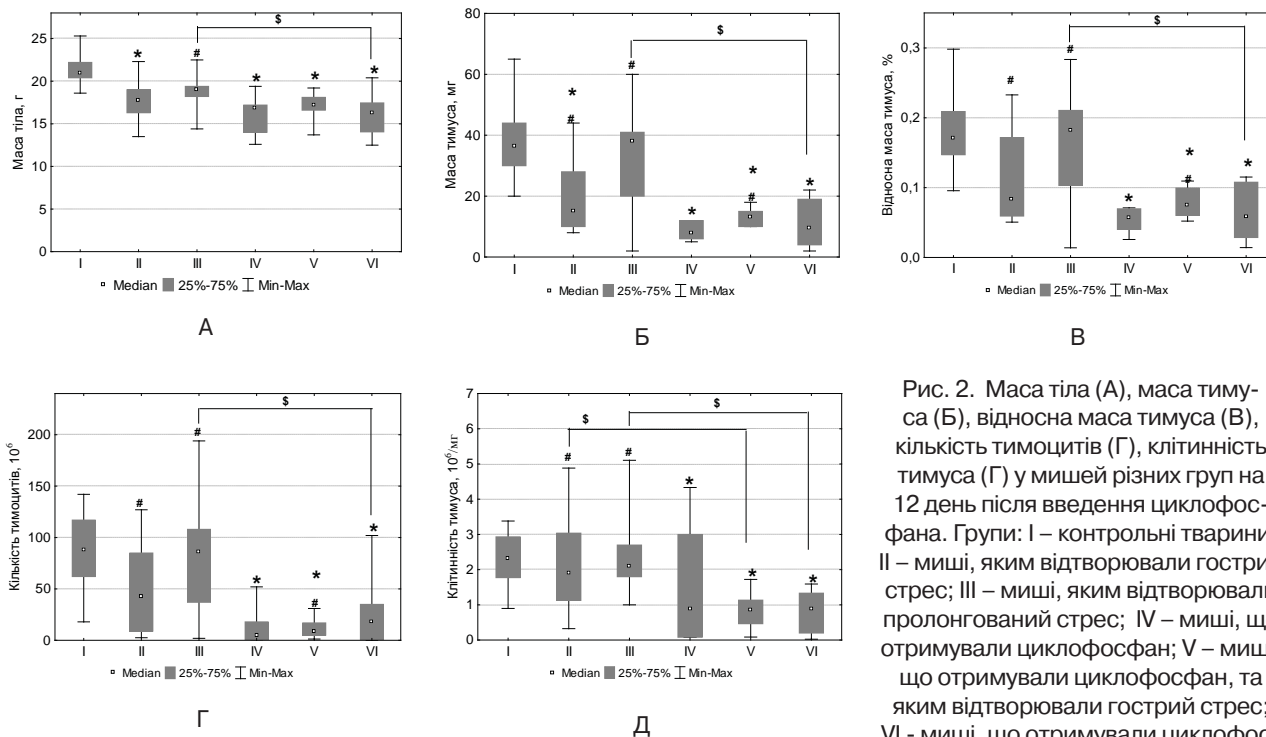


Рис. 2. Маса тіла (А), маса тимуса (Б), відносна маса тимуса (В), кількість тимоцитів (Г) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали пролонгований стрес. \* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей що отримували циклофосфан; \$ –  $p < 0,05$  порівняння між групами.

Інші визначені показники активності імунної системи практично не змінювалися. При пролонгованому стресі зниження показників тимуса не

відбувалося, як і зменшення проліферуючих клітин лімфатичних вузлів брижі. Відміннявся і тромбоцитоз.

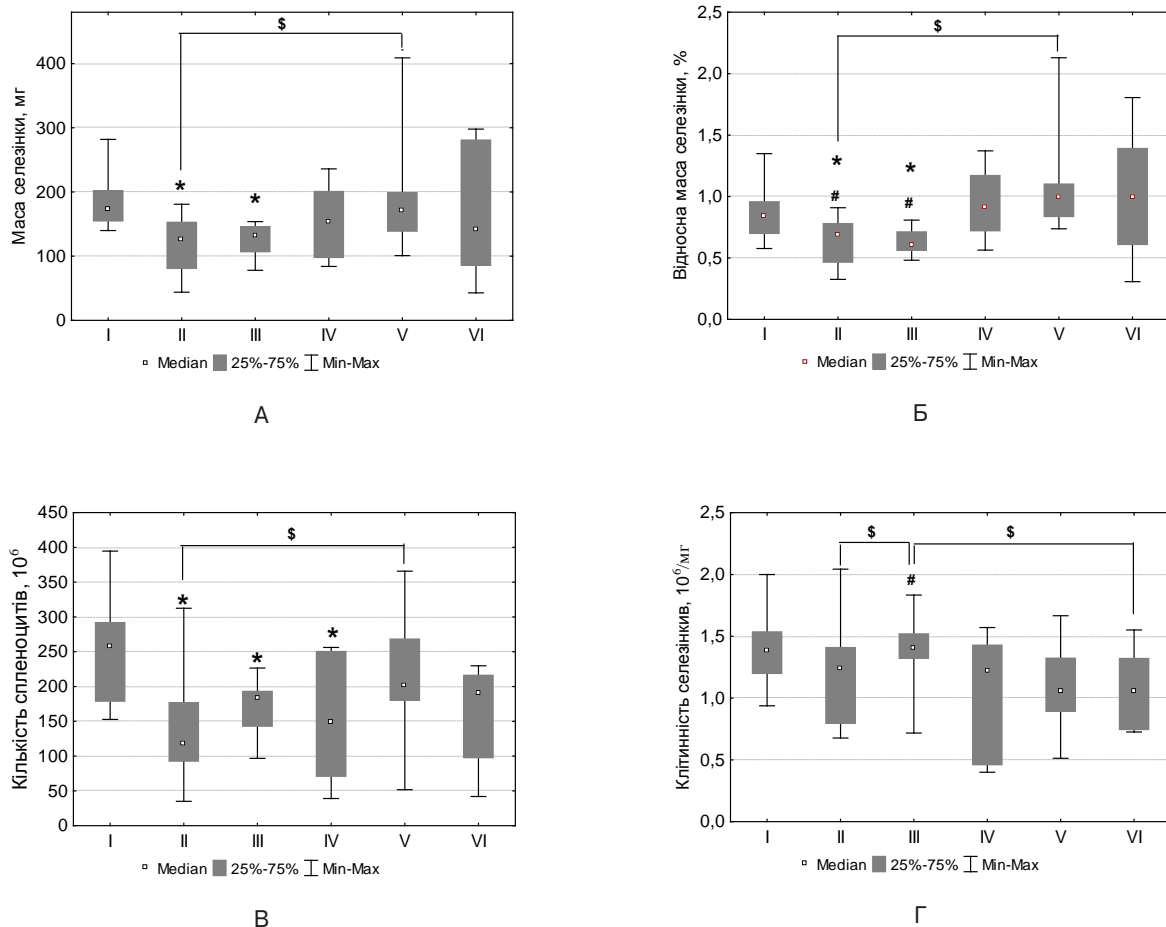


Рис. 3. Маса селезінки (А), відносна маса селезінки (Б), кількість спленоцитів (В), клітинність селезінки (Г) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали гострий стрес; VI - миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали пролонгований стрес. \* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей що отримували циклофосфан; \$ –  $p < 0,05$  порівняння між групами.

Таким чином, при пролонгованому стресі спостерігалось пригнічення стресової катаболічної дії стресових факторів по тимусним показникам і відміна мобілізації тромбоцитів із кісткового мозку. Таку дію пролонгованого стресу можна розцінювати як позитивну, оскільки звичайно тромбоцитоз виникає при надмірному подразненні кісткового мозку.

Дані свідчать, що при пролонгованому стресі не відбувається сумація дії кількох індукцій стресу з поглибленням стресових змін. Скоріш за все, при повторювальних відтвореннях помірного холодного стресу ефект зобов'язаний своїй появі формуванню стресового режиму тренування із зменшенням катаболічного ефекту [17] і реалізації його адаптогенної активності. Цьому

сприяв і досить не різкий вплив на організм застосованих у роботі навантажень, при яких вміст у крові лейкоцитів різних типів практично не відрізнявся від норми.

Для характеристики розвитку процесів, індукованих комбінованою дією ЦФ і стресів, коли функціонування регуляторних систем може бути суттєво змінено ЦФ, перш за все треба було з'ясувати її вплив на гемопоез. Встановлено, що кількість клітин кісткового мозку (рис. 4) у всіх групах мишей принципово не відрізнялась, що співпадає з раніше отриманими даними. Це свідчить, що у мишей, що отримували ЦФ, на 12 день після введення цитостатика практично відбувалося відновлення кісткового мозку. Стреси помітно не впливали на цей процес.

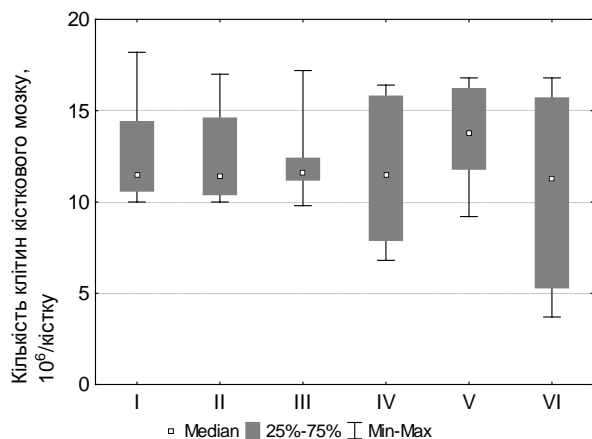
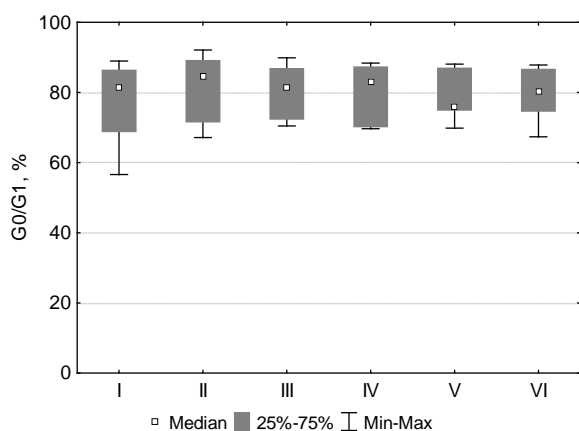
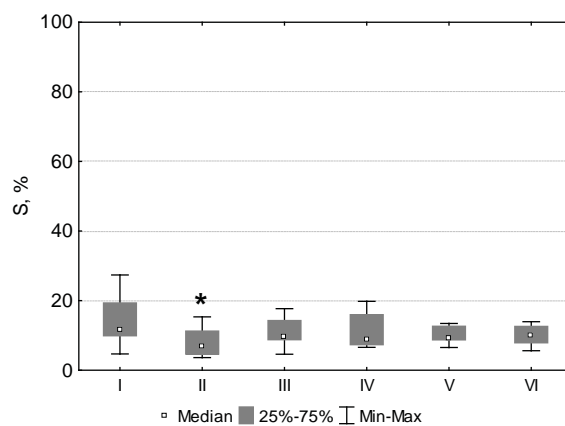


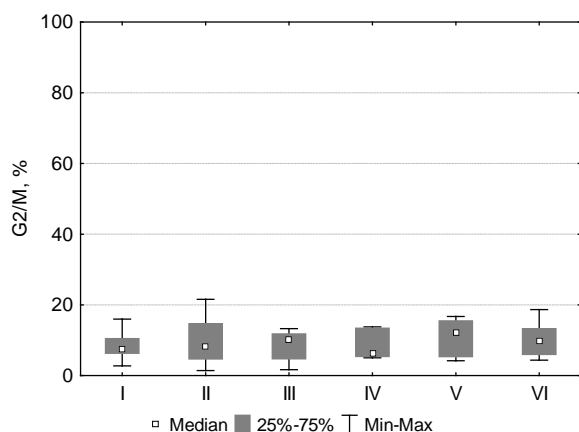
Рис. 4. Кількість клітин кісткового мозку у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали пролонгований стрес.



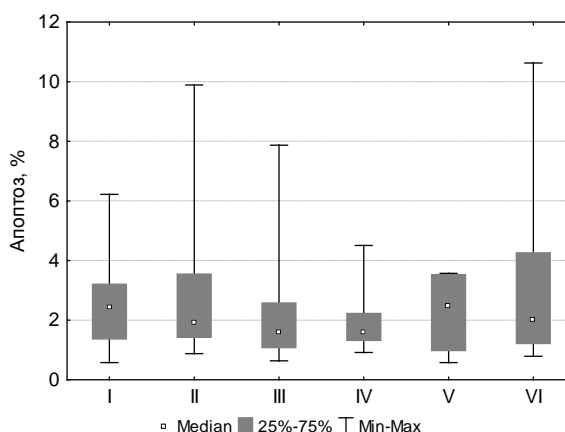
A



Б



В



Г

Рис. 5. Кількість клітин лімфатичних вузлів брижі у різних фазах клітинного циклу: G0/G1 (А), S (Б), G2/M (В) і апоптозі (Г) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали пролонгований стрес.  
\* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей.

Кількість еритроцитів (рис. 6А), гемоглобіну (рис. 6Б) і гематокрит (рис. 6В) також практично не відрізнялась від контролю, за виключенням суттєво підвищеного вмісту гемоглобіну у ми-

шей з гострим стресом, що отримували ЦФ. Є дані, що холодний стрес за певних умов може стимулювати еритропоез [18, 19].

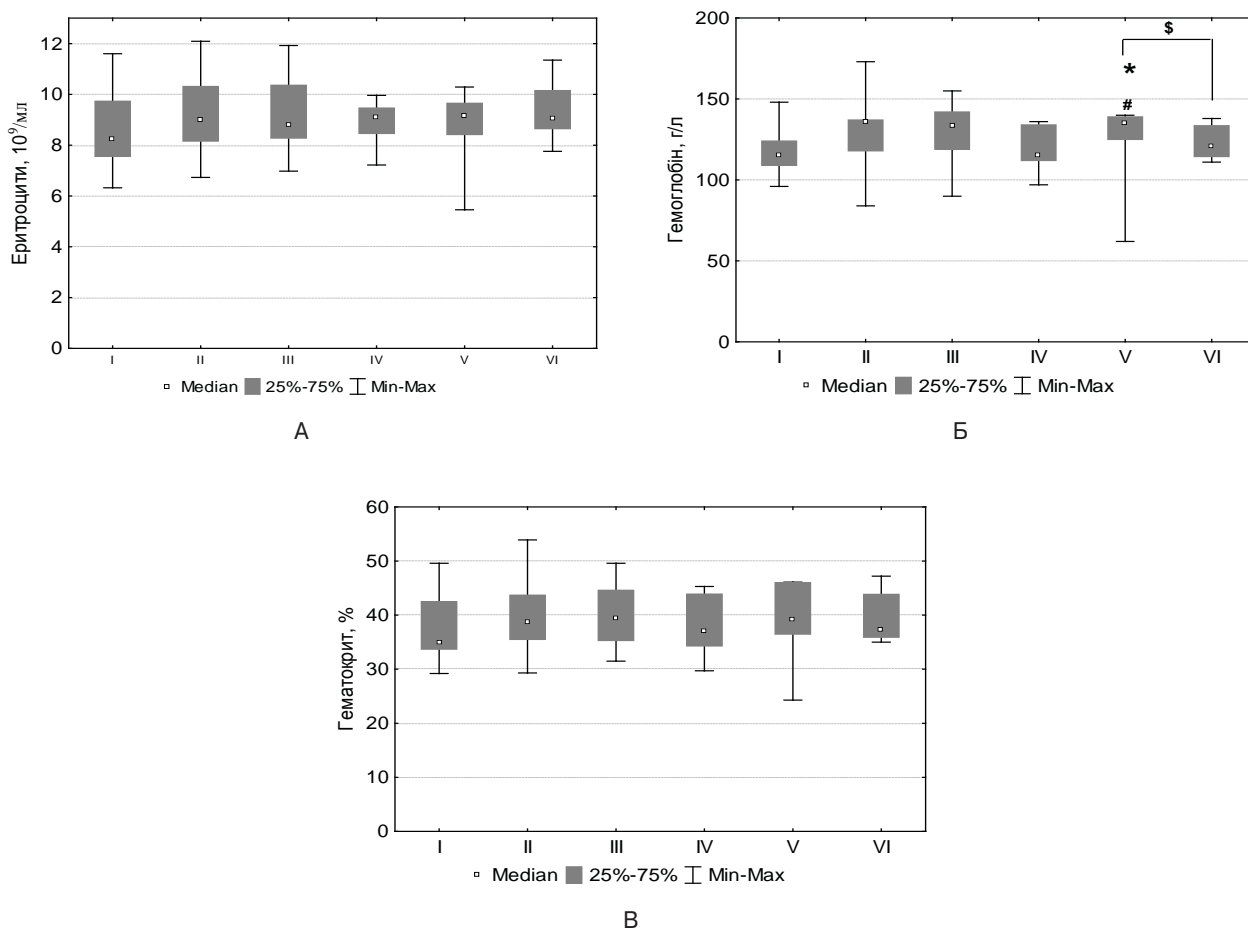
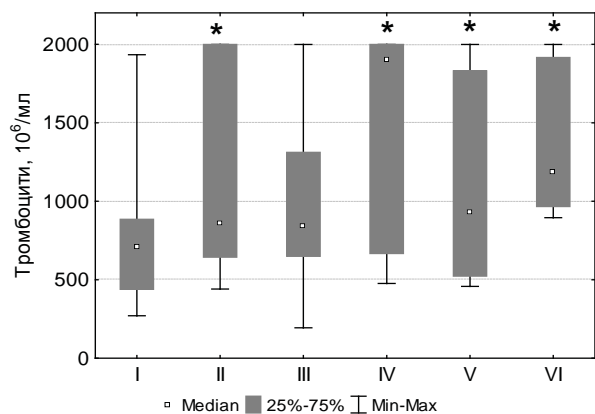


Рис. 6. Кількість еритроцитів (А), гемоглобіну (Б) та гематокрит (В) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали пролонгований стрес. \* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; \$ –  $p < 0,05$  порівняння між групами.

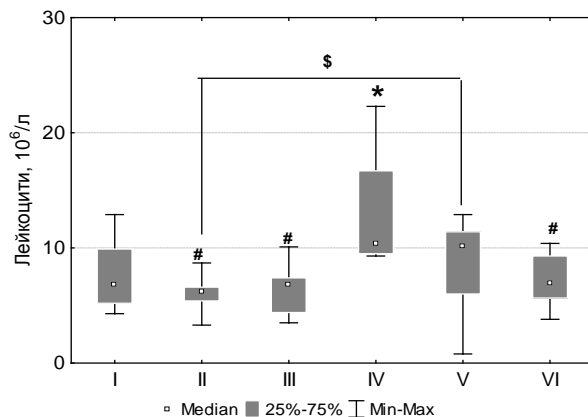
Кількість клітин лімфатичних вузлів брижі в різних фазах клітинного циклу (рис. 5А, 5Б, 5В) і апоптозі (рис. 5Г) також знаходилась на одному з контролем рівні, що, разом з даними про нормалізацію кількості клітин кісткового мозку і підвищення вмісту гемоглобіну свідчить про важливість для розвитку стресових реакцій не тільки особливостей стресових факторів, а і стану функціональних систем організму [10].

Разом з викладеними результатами отримані дані і про існування на 12 день від введення ЦФ і активаційних реакцій. Так, фактично в усіх групах був виявлений тромбоцитоз (рис. 7А), що, як вважається, відображає більший темп утворення тромбоцитів і підви-

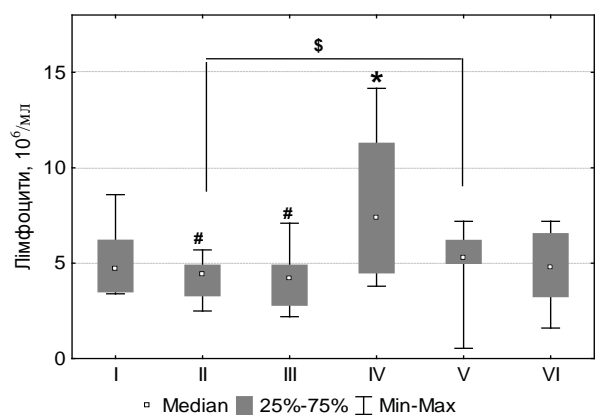
щену швидкість їх мобілізації у циркуляцію. Під впливом ЦФ у периферичній крові значно підвищувалась кількість лейкоцитів (рис. 7Б). Дані про таку мобілізаційну дію ЦФ відомі [20]. Мобілізація лімфоцитів (рис. 7В), гранулоцитів (рис. 7Г) і моноцитів (рис. 7Г) зберігалася при відтворенні у цих тварин гострого, але не пролонгованого стресу, під впливом якого відбувалася відміна мобілізації. Таким чином, пролонгований стрес, на відміну від гострого, проявляє регуляторну дію по відношенню до циклофосфаної кістково-мозкової мобілізації. Сумації дії кількох послідовних індукцій стресу з поглибленням ефекту стресових реакцій за даних умов не відбувається.



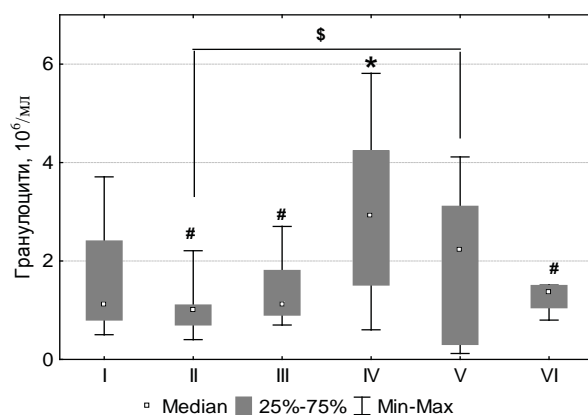
А



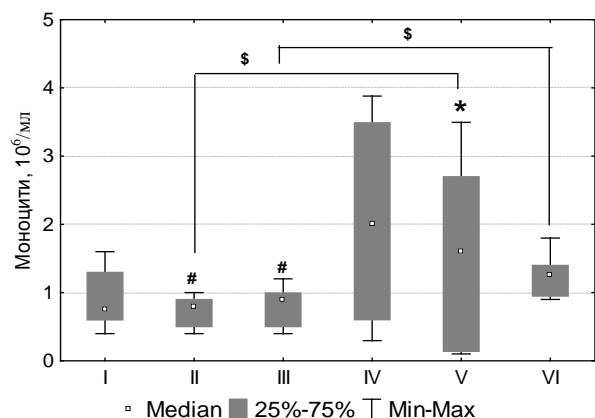
Б



В



Г



Д

Рис. 7. Кількість тромбоцитів (А), лейкоцитів (Б), лімфоцитів (В), гранулоцитів (Г), моноцитів (Д) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали пролонгований стрес. \* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; \$ –  $p < 0,05$  порівняння між групами.

В процесі експерименту у мишей, що отримували ЦФ, суттєво знижувалась маса тіла (рис. 2А). При комбінації введення ЦФ і відтворення пролонгованого стресу маса тіла не відрізнялася від тієї, що була при введенні тільки ЦФ. Ці дані показують зміни, що виникають у результаті катаболічних процесів при стресах і введенні ЦФ.

У мишей, що отримували ЦФ, всі показники тимуса (рис. 2Б, 2В, 2Г, 2Д) були значно знижені. При додатковому відтворенні гострого, але не пролонгованого стресу, маса тимуса (рис. 2Б) і відносна маса тимуса (рис. 2В) перевищувала ту, що була у мишей з ЦФ. Таким чином, у даному випадку по відношенню до показників маси тимуса стимулюючу дію виявляв гострий стрес, мабуть, за рахунок катаболічних процесів, як і при стимуляції гемоглобіноутворення. На кількість тимоцитів (рис. 2Г) і клітинність тимуса (рис. 2Д) при введенні ЦФ обидва типи стресів мало впливали.

На масу селезінки (рис. 3А), відносну масу селезінки (рис. 3Б), а також її клітинність (рис. 3Г) при комбінованій дії стреси не впливали. Але кількість спленоцитів (рис. 3В) при гострому стресі відносно норми не зменшувалася, на відміну від пролонгованого, підкреслюючи певні особливості дії різних стресів, мабуть, обумовлені різною інтенсивністю стресозалежної стиму-

ляції  $\alpha$ - і  $\beta$ -адренергічних рецепторів з виходом із селезінки лімфоцитів і нейтрофілів [21].

В результаті введення ЦФ показники фагоцитозу: поглинальна активність перитонеальних

макрофагів (рис. 8А) і GeoMaep фагоцитуючих перитоніальних макрофагів (рис. 8Б) майже не змінювались, як і природна цитотоксична активність клітин лімфатичних вузлів брижі (рис. 8В).

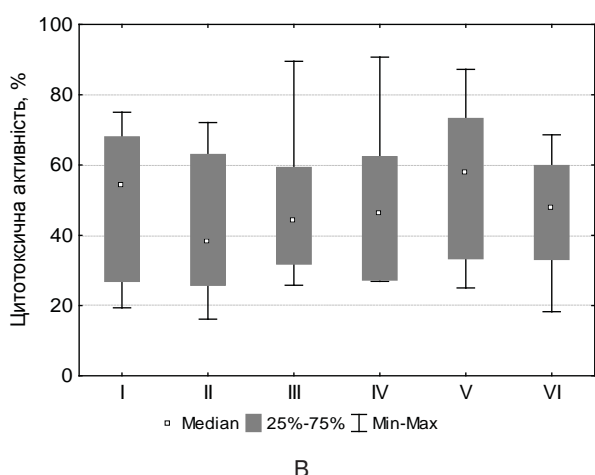
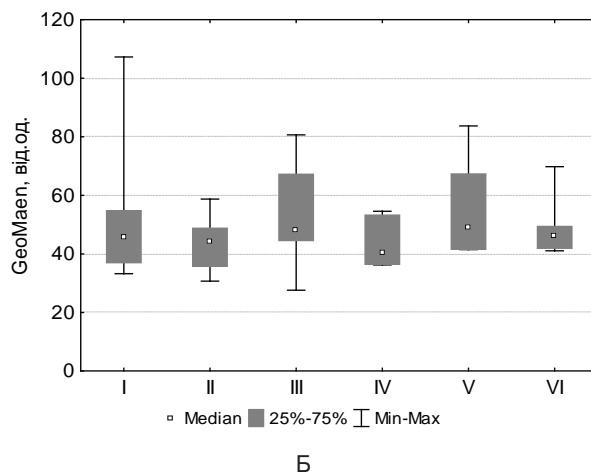
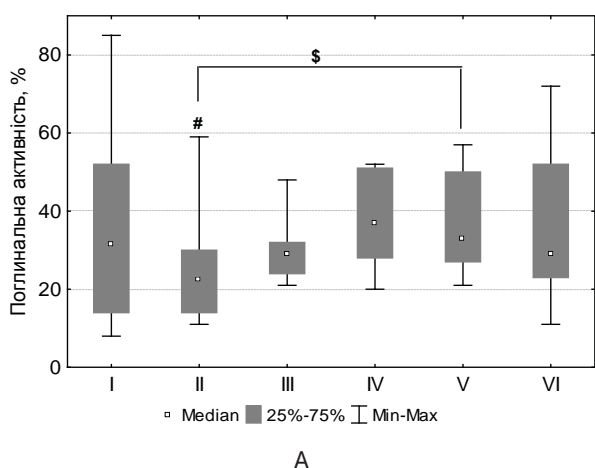


Рис. 8. Показники фагоцитозу перитонеальних макрофагів (А – поглинальна активність; Б – GeoMaep фагоцитуючих перитоніальних макрофагів) та цитотоксична активність клітин лімфатичних вузлів брижі (В) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали гострий стрес; VI – миші, що отримували циклофосфан, та яким відтворювали пролонгований стрес. \* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; \$ –  $p < 0,05$  порівняння між групами.

Практично не змінювалась і активність ГСТ (рис. 9А). Відомо, що холодової стрес може викликати невиражену імунодепресію [5]. В результаті введення ЦФ в селезінці значно зменшувалася кількість АУК (рис. 9Б), а у сироватці крові знижувався рівень гемаглютинінів (рис. 9В). При комбінації стресів і введення ЦФ спостерігалось значне зниження при пролонгованому, але не гострому, стресі, кількості АУК (рис. 9Б). Таким чином, формування АУК стимулювалося гострим стресом. Пролонгований стрес у мишей, що отримували ЦФ, не впливав на процес антитілоутворення.

Маючи на увазі, що ЦФ пригнічує імунну систему і природну, і адаптивну в цілому, можна припустити, що до 12 дня від введення ЦФ імун-

на система вже багато у чому відновлювалася, а виходячи з наявної кістково-мозкової мобілізації і ознак глибокого ураження тимуса, можна припустити, що процес регенерації імунної системи продовжується, що потребує розробки підходів до ефективного втручання в імунну систему у цьому періоді.

Таким чином, при відтворенні помірного гострого холодового стресу відбувалося зниження маси тимуса, відносної маси тимуса і кількості тимоцитів, а також кількості клітин лімфатичних вузлів брижі у S-фазі клітинного циклу. Розвивався тромбоцитоз (таблиця 1). При пролонгованому стресі всі зазначені показники були у межах норми.



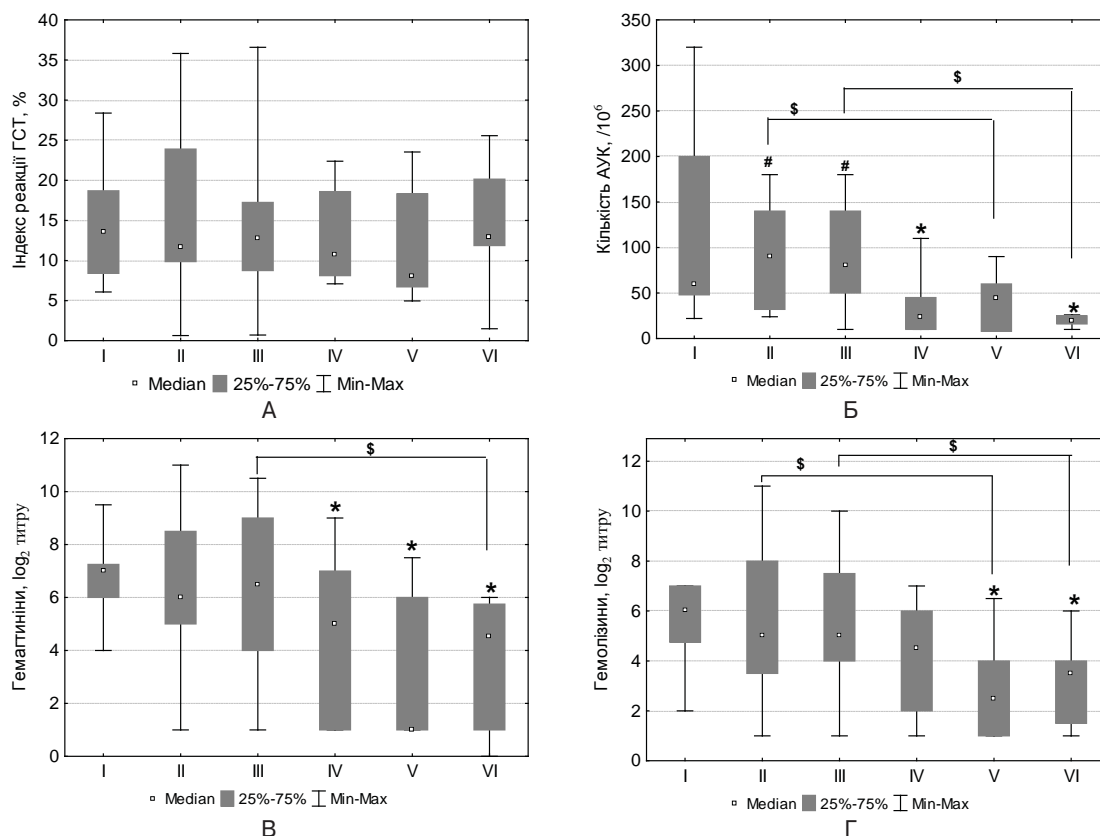


Рис. 9. Індекс ГСТ (А), АУК (Б), гемаглініни (В), гемолізени (Г) у мишей різних груп на 12 день після введення циклофосфана. Групи: I – контрольні тварини; II – миші, яким відтворювали гострий стрес; III – миші, яким відтворювали пролонгований стрес; IV – миші, що отримували циклофосфан; V – миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали гострий стрес; VI - миші, що отримували циклофосфан та яким відтворювали пролонгований стрес. \* –  $p < 0,05$  порівняно з групою нормальних мишей; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою мишей, що отримували циклофосфан; \$ –  $p < 0,05$  порівняння між групами.

Таблиця 1

**Особливості впливу гострого та пролонгованого стресів на нормальних тваринах і тих, що отримували ЦФ**

Показники	Гострий стрес	Пролонгований стрес
	Нормальні миші	
Маса тимуса	зниження	–
Відносна маса тимуса	зниження	–
Кількість тимоцитів	зниження	–
Кількість клітин лімфовузлів брижі у S-фазі	зниження	–
Кількість тромбоцитів	підвищення	–
	Миші, що отримували ЦФ	
Вміст гемоглобіну	підвищення	–
Мобілізація лейкоцитів, гранулоцитів, лімфоцитів, моноцитів	–	відміна відміна відміна відміна
Зменшення маси тимуса, відносної маси тимуса, кількості спленоцитів	збільшення збільшення	– –
кількості АУК	відміна відміна	– –

Відтворення гострого стресу у мишей, що отримували ЦФ, призводило до підвищення у крові кількості гемоглобіну, збереженню процесу мобілізації лейкоцитів, гранулоцитів, лімфоцитів і моноцитів із кісткового мозку і кількості спленоцитів у селезінці, позитивному впливу на масу і відносну масу тимуса, а також формуванню імунізованими тваринами нормальної кількості АУК у селезінці. При пролонгованому стресі не було підвищеного рівня гемоглобіну, відбувалася відміна кістково-мозкової мобілізації, була менша маса і відносна маса тимуса, знижувалася кількість спленоцитів і здатність до формування в селезінці АУК.

### ВИСНОВКИ

1. Помірний гострий холодний стрес негативно впливав на масу і клітинність тимуса, знижував проліферативну активність клітин брижових лімфатичних вузлів, проявляючи катаболічну активність, а також індукував тромбоцитоз. При пролонгованому стресі сумації ефектів від послідовної індукції кількох стресових реакцій не відбувалося. Навпаки, пролонгований стрес сприяв збереженню нормального рівня тимусних показників і відміняв тромбоцитоз і підвищену проліферацію клітин брижових лімфатичних вузлів, що можна розцінювати як прояв його адаптогенної дії.
2. Стан імунної системи через 12 днів після ведення ЦФ характеризувався глибоким зниженням маси і клітинних показників тимуса, ураженням процесу формування АУК, тромбоцитозом і мобілізацією міграції із кісткового мозку лейкоцитів, гранулоцитів, лімфоцитів і моноцитів. Відтворення пролонгованого, але не гострого, стресу, мобілізацію відміняло, що свідчить про наявність гомеостатичного механізму у дії пролонгованого стресу при індукованому ЦФ імунодефіциті. Але у той же час відновлення тимуса при ньому затримувалося, знижувалася кількість спленоцитів і пригнічувалося формування АУК.
3. Отримані дані свідчать про різний механізм дії на імунну систему гострого і пролонгованого помірнього стресу в умовах їх відтворення у нормальних мишей і у тварин, які отримували 200 мг/кг маси тіла циклофосфану. Дію пролонгованого стресу у нормальних мишей можна розцінювати як позитивну адаптогенну. У тварин, що отримували ЦФ, спостерігалася негативна дія пролонгованого стресу, що свідчить про значну залежність реалізації дії стресових факторів від вихідного функціонального стану організму.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *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.
2. *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.
3. *Link D.C.* 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.
4. *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. 4711-19.
5. *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. 884–91.
6. *Nikolskaya EI, Butenko GM.* Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches / Nikolskaya EI, Butenko GM. // *Cell and organ transplantation*. – 2016. Vol. 4, N 1. – P. 82-100.
7. *Dejbakhsh-Jones S.* Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells / Dejbakhsh-Jones S, Jerabek L, Weissman IL, Strober S. // *J Immunol*. – 1995. – Vol. 155, N 7. – P. 3338-44.
8. *Craddock CF.* Circulating stem cells in mice treated with cyclophosphamide / Craddock CF, Apperley JF, Wright EG et al. // *Blood*. – 1992. - Vol. 80, N 1. – P. 264-9.
9. *Berthou C.* Ranzyme B and perforin lytic proteins are expressed in CD34+ peripheral blood progenitor cells mobilized by chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor / Berthou C, Marolleau JP, Lafaurie C. et al. // *Blood*. – 1995. – Vol. 86, N 9. – P. 3500-6.
10. *Балицкий К.П.* Стресс и метастазирование злокачественных опухолей / Балицкий К.П, Шмалько Ю.П. // Киев: Наукова Думка, 1987. - 245с.
11. *Krizanova O.* Stress, catecholaminergic system and cancer / Krizanova O, Babula P, Pacak K. // *Stress*. – 2016. – Vol. 19, N 4. – P. 419-28.
12. *Rosenne E.* In vivo suppression of NK cell cytotoxicity by stress and surgery: glucocorticoids have a minor role compared to cat-

- echolamines and prostaglandins / Rosenne E, Sorski L, Shaashua L. et al. // *Brain Behav Immun.* – 2014. – Vol. 37. – P. 207-19.
13. *Sugiura H.* Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice / Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. // *J Appl Physiol.* – 2001. – Vol. 90, N 3. – P. 789-94.
  14. *Mossman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay / Mossman T. // *J Immunol Methods.* – 1983. – Vol. 65, N 1-2. – P. 55-63.
  15. *Frimmel G.* Immunological methods edited by Frimmel G / Frimmel G. // *Moscow: The world.* – 1987. – P. 472.
  16. *Boehm T.* Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment / Boehm T, Bleul CC. // *Trends Immunol.* – 2006. – Vol. 27, N 10. – P. 477-84.
  17. *Гаркави Л.Х.* Антистрессорные реакции и активационная терапия / Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С. // *ИМЕДИС.* – 1988. – 565с.
  18. *Schmelzer E.* Response of Human Fetal Liver Progenitor Cell Types to Temperature and pH Stresses In Vitro / Schmelzer E, Foka HG, Thompson RL et al. // *Rejuvenation Res.* – 2018. – Vol. 21, N 3. – P. 257-69.
  19. *Maekawa S.* Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature / S.Maekawa, H.Iemura, T.Kato // *J Exp Biol.* – 2013. – Vol. 216, Pt. 5. – P. 901-8.
  20. *Nedeau A.E.* CXCL5- and bFGF-dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / Nedeau A.E., Bauer R.J., Gallagher K.A. // *Exp Cell Res.* - 2008. – Vol. 314, N 11-12. – P. 2176-86.
  21. *Ernst m U.* Effects of adrenergic alpha- and beta-receptor stimulation on the release of lymphocytes and granulocytes from the spleen / U.Ernst m, G.Sandberg // *Scand J Haematol.* – 1973. – Vol. 11, N 4. – P. 275-86.

## РЕЗЮМЕ

### ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ СТРЕСОВИХ РЕАКЦІЙ НА РЕГЕНЕРУЮЧУ ІМУННУ СИСТЕМУ ПІСЛЯ ДІЇ ЦИКЛОФОСФАНА

Семенова Я.-М.О., Нікольська В.В.

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

Помірний гострий холодний стрес негативно впливав на масу і клітинність тимуса, знижував проліферативну активність клітин брижових лімфатич-

них вузлів, проявляючи катаболічну активність, а також індукував тромбоцитоз. При пролонгованому стресі сумації ефектів від послідовної індукції кількох стресових реакцій не відбувалося. Навпаки, пролонгований стрес сприяв збереженню нормального рівня тимусних показників і відміняв тромбоцитоз і підвищену проліферацію клітин брижових лімфатичних вузлів, що можна розцінювати як прояв його адаптогенної дії. Стан імунної системи через 12 днів після введення ЦФ характеризувався глибоким зниженням маси і клітинних показників тимуса, ураженням процесу формування антитілоутворюючих клітин (АУК), тромбоцитозом і мобілізацією міграції із кісткового мозку лейкоцитів, гранулоцитів, лімфоцитів і моноцитів. Відтворення пролонгованого, але не гострого стресу мобілізацію відміняло, що свідчить про наявність гомеостатичного механізму у дії пролонгованого стресу при індукованому ЦФ імунодефіциті. Але у той же час відновлення тимуса при ньому затримувалося, знижувалася кількість спленоцитів і пригнічувалося формування АУК. Отримані дані свідчать про різний механізм дії на імунну систему гострого і пролонгованого помірного стресу в умовах їх відтворення у нормальних мишей і у тварин, які отримували 200 мг/кг маси тіла циклофосфану. Дію пролонгованого стресу у нормальних мишей можна розцінювати як позитивну адаптогенну. У тварин, що отримували ЦФ, спостерігалася негативна дія пролонгованого стресу, що свідчить про значну залежність реалізації дії стресових факторів від вихідного функціонального стану організму.

**Ключові слова:** холодний стрес, імунна система, циклофосфан.

## РЕЗЮМЕ

### ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЙ НА РЕГЕНЕРИРУЮЩУЮ ИММУННУЮ СИСТЕМУ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАНА

Семенова Я.-М.А., Никольская В.В.

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», г. Киев

Умеренный острый холодный стресс отрицательно влиял на массу и клеточность тимуса, снижал пролиферативную активность клеток брыжеечных лимфатических узлов, проявляя катаболическую активность, а также индуцировал тромбоцитоз. При пролонгированном стрессе сумації эффектов от последовательной индукции нескольких стрессовых реакций не происходило, напротив, пролонгированный стресс способствовал сохранению нормального уровня тимусных показателей и отменял тромбоцитоз и повышенную пролиферацию клеток брыжеечных лимфатических узлов, можно расценивать как проявление его адаптогенного действия. Состояние иммунной системы через 12 дней после введения ЦФ характеризовалось глубоким снижением массы и клеточных показателей тимуса, поражением процесса формирования антителообразующих клеток (АУК), тромбоцитозом и мобилизацией миграции из костного мозга лейкоцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов. Воспроизведение

продовженого, але не гострого, стреса мобілізацію скасувало, що свідчить про наявність гомеостатичного механізму в дії продовженого стреса при індукції ЦФ імунodefіциті. Але в той же час відновлення тимуса при ньому затримувалося, зменшувалося кількість спленцитів і гальмувалося формування АОК. Отримані дані свідчать про різні механізми дії на імунну систему гострого і продовженого помірної стреса в умовах їх вироблення у звичайних мишей і у тварин, отримавших 200 мг/кг маси тіла циклофосфану. Діяння продовженого стреса у звичайних мишей можна розцінювати як позитивне адаптогенне. У тварин, отримавших ЦФ, спостерігалося негативне вплив продовженого стреса, що свідчить про значимість реалізації дії стресових факторів від початкового функціонального стану організму.

**Ключевые слова:** холодний стрес, імунна система, циклофосфан.

### SUMMARY

#### FEATURES OF THE INFLUENCE OF STRESS REACTIONS ON THE REGENERATING IMMUNE SYSTEM AFTER THE ACTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE

*Semenova Ya. -M.A., Nikolska V.V.*

State Institution «Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv

Moderate acute cold stress negatively affected the mass and cellularity of the thymus, reduced the proliferative activity of mesenteric lymph node cells, show-

ing catabolic activity, and also induced thrombocytosis. With prolonged stress, the summation of the effects of the sequential induction of several stress reactions did not occur; on the contrary, prolonged stress helped maintain a normal level of thymic parameters and abolished thrombocytosis and increased proliferation of mesenteric lymph node cells, which can be regarded as a manifestation of its adaptogenic effect. The state of the immune system 12 days after the administration of CF was characterized by a deep decrease in the mass and cellular parameters of the thymus, damage to the formation of antibody-forming cells (AUC), thrombocytosis, and mobilization of leukocytes, granulocytes, lymphocytes, and monocytes from the bone marrow. The reproduction of prolonged, but not acute, stress mobilization was canceled, which indicates the presence of a homeostatic mechanism in the action of prolonged stress in the event of CF-induced immunodeficiency. But at the same time, the restoration of the thymus was delayed, the number of splenocytes decreased and the formation of AOK was suppressed. The data obtained indicate different mechanisms of action of acute and prolonged moderate stress on the immune system under conditions of their reproduction in normal mice and in animals that received 200 mg / kg of cyclophosphamide body weight. The effect of prolonged stress in normal mice can be regarded as adaptogenic positive. In animals treated with CF, a negative effect of prolonged stress was observed, which indicates a significant dependence of the implementation of the action of stress factors on the initial functional state of the body.

**Key words:** cold stress, immune system, cyclophosphamide.

### АВТОРСЬКА ДОВІДКА

#### Семёнова Янина-Мария Алексеевна

Г. Киев, ул. Вышгородская, 67, младший научный сотрудник ГУ «Института генетической и регенеративной медицины» НАМН Украины  
Моб. тел.: 067-151-94-30  
E-mail: [yanina-mariya@ukr.net](mailto:yanina-mariya@ukr.net)

#### Никольская Валентина Васильевна

Г. Киев, ул. Вышгородская, 67. Ведущий научный сотрудник ГУ «Института генетической и регенеративной медицины» НАМН Украины  
Моб. тел.: 097-952-66-96  
E-mail: [nikolskaya.kiev@gmail.com](mailto:nikolskaya.kiev@gmail.com)

#### Семенова Яніна-Марія Олексіївна

М. Київ, вул. Вишгородська, 67. Молодший науковий співробітник ДУ «Інституту генетичної та регенеративної медицини» НАМН України  
Моб. тел.: 067-151-94-30  
E-mail: [yanina-mariya@ukr.net](mailto:yanina-mariya@ukr.net)

#### Нікольська Валентина Василівна

М. Київ, вул. Вишгородська, 67. Провідний науковий співробітник ДУ «Інституту генетичної та регенеративної медицини» НАМН України.  
Моб. тел.: 097-952-66-96  
E-mail: [nikolskaya.kiev@gmail.com](mailto:nikolskaya.kiev@gmail.com)

#### Semenova Yanina-Mariya

Kyiv, str. Vyshgorodska, 67. Junior researcher at the Institute of Genetic and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine.  
Mob. tel.: 067-151-94-30  
E-mail: [yanina-mariya@ukr.net](mailto:yanina-mariya@ukr.net)

#### Nikolska Valentyna

Kyiv, st. Vyshgorodska, 67. Leading Researcher, Institute of Genetic and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine.  
Mob. tel.: 097-952-66-96  
E-mail: [nikolskaya.kiev@gmail.com](mailto:nikolskaya.kiev@gmail.com)