

**И. Ф. Лабунец, А. Е. Родниченко, Г. И. Парамонова, В. М. Кирик, Н. В. Сыкало,  
В. В. Олар, Г. М. Бутенко, В. В. Безруков**

*Государственное учреждение «Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины», 04114 Киев*

## **ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО БОЛЕВОГО СИНДРОМА У ЖИВОТНЫХ**

В опытах на животных разного возраста исследовано влияние хронической (нейропатической) боли на функциональное состояние центрального и периферического звеньев иммунной системы. Нейропатическую боль у взрослых и старых мышей и крыс моделировали путем перевязки седалищного нерва; исследования проводили через 2 и 4 недели после травмы нерва. Было показано, что при старении снижается уровень в крови тимулина, масса и клеточность тимуса, фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, а также количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и уровень антител в крови иммунизированных животных. Реакция иммунной системы на хроническую/нейропатическую боль имеет возрастные особенности. Так, у старых мышей после травмы нерва, в отличие от взрослых, показатели не изменялись (уровень в крови тимулина), изменялись в меньшей (снижение массы и клеточности тимуса) или большей степени (снижение количества АОК в селезенке, уровень антител в крови), а также с другой направленностью (повышение активности макрофагов). Под влиянием хронической боли наблюдались изменения в лейкоцитарной формуле периферической крови взрослых крыс которые более выражены у старых подопытных особей. Обсуждаются значение возрастных нарушений внутрисистемных взаимодействий в механизмах изменений характера иммунных реакций на хроническую (нейропатическую) боль в старом организме.

**Ключевые слова:** нейропатическая боль, иммунная система, старение

Известно, что хронический болевой синдром (ХБС) сопровождается многими патологическими состояниями, приводит к нарушениям функционирования ряда систем организма и значительному снижению его адаптационных возможностей [2, 6]. При ХБС изменяется функциональное состояние и иммунной системы [1, 20, 36]. Так, установлено, что при длительных стрессовых ситуациях формируются вторичные иммунодефицитные состояния с нарушением клеточных и гуморальных иммунных реакций. В свою очередь, в эксперименте показано, что такие факторы иммунной

системы, как цитокины (интерлейкин (ИЛ)-1 $\beta$ , ИЛ-6, тумор некротический фактор (ТНФ- $\alpha$ ) и клетки (нейтрофилы, макрофаги, Т-лимфоциты и др.) являются важными посредниками в развитии болевых синдромов [20, 30, 36]. При этом направленность влияния иммунных факторов на болевые реакции может измениться в динамике развития ХБС [30]. Болевой синдром у животных можно воспроизвести введением ИЛ-1 $\beta$ , ТНФ- $\alpha$ . Макрофаги в первые дни после моделирования нейропатической боли (перевязка седалищного нерва) участвуют в развитии воспаления

### **Лаборатория патофизиологии и иммунологии**

Г. М. Бутенко — зав. лаборатории, акад. НАМН Украины

И. Ф. Лабунец — с.н.с., д.м.н. (irina\_labunets@ukr.net)

А. Е. Родниченко — н.с., к.б.н.

В. М. Кирик — с.н.с., к.м.н.

### **Лаборатория физиологии**

В. В. Безруков — директор института, зав.лаборатории, акад. НАМН Украины

Г. И. Парамонова — в.н.с., д.б.н.

Н. В. Сыкало — в.н.с., к.б.н.

В. В. Олар — м.н.с.

© И. Ф. Лабунец, А. Е. Родниченко, Г. И. Парамонова, В. М. Кирик, Н. В. Сыкало, В. В. Олар, Г. М. Бутенко, В. В. Безруков, 2016.

в зоне травмы, синтезируя провоспалительные цитокины, а затем они проявляют противовоспалительное действие путем синтеза противовоспалительных цитокинов. Двойственная направленность влияния на нейропатическую боль свойственна и *T*-лимфоцитам.

К факторам иммунной системы, которые способны участвовать в реализации анальгезирующих и противовоспалительных эффектов при развитии ХБС, можно отнести гормоны тимуса. Так, установлено, что эффективность тимического сывороточного фактора/тимулина в лечении гипералгезии может быть связана с его непосредственным влиянием в зоне повреждения на афферентные нервные окончания и синтез простагландина Е, с угнетением образования провоспалительных цитокинов и, наоборот, усилением образования ИЛ-10, с регуляцией функционирования *T*-субпопуляций лимфоцитов и макрофагов [22, 29, 34]. Кроме того, тимулин действует на функциональное состояние гипофизарно-надпочечниковой системы, гормоны которой вовлекаются в развитие стрессовых реакций, а также изменяют функции иммунной системы [9, 35]. Вместе с тем, эндокринная функция тимуса при нейропатической боли остается практически не исследованной.

Особый интерес вызывает изучение характера иммунных реакций при ХБС в старом организме. Известно, что при старении как у человека, так и животных снижается уровень тимулина в циркуляции, нарушаются *T*-клеточные функции (пролиферация, цитотоксичность, образование цитокинов), формируется дисбаланс не только между *T*-хелперами и *T*-супрессорами, но и *T*-хелперами 1 и 2 типа с преобладанием развития гуморальных иммунных реакций [10, 24, 27]. С возрастом изменяется функционирование *B*-лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов [28, 33, 37]. Возрастные нарушения функционального состояния иммунной системы и ее взаимодействий с нейроэндокринной системой могут способствовать изменению характера иммунных реакции на хронические стрессовые влияния, а значит отразиться и на адаптационных возможностях этой системы [12, 35].

Цель работы – исследовать у животных разного возраста на модели нейропатической боли особенности изменений функционирования центрального и периферического звеньев иммунной системы.

**Материал и методы.** Экспериментальная работа выполнена на взрослых (3-4 мес,  $n=31$ ) и старых (21-22 мес,  $n=31$ ) мышах линии *CBA/Сa*, а также взрослых (6-7 мес,  $n=16$ ) и старых (26-27 мес,  $n=16$ ) крысах линии Вистар стадного питомника нашего института. Животные содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище и естественном режиме освещения. Все работы

с экспериментальными животными проводились с соблюдением принципов биоэтики [3, 17] и с разрешения этической комиссии ГУ «Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины».

**Экспериментальные группы животных.** Нейропатическую боль у мышей и крыс разного возраста моделировали путем перевязки седалищного нерва. Операции проводили под пентобарбиталовым наркозом (25 мг/кг массы). В качестве контроля служили ложноперирированные животные соответствующего возраста. Мышей контрольных и опытных групп исследовали через 2 и 4 недели после операции. Часть мышей, которых брали в опыт через 4 недели после травмы нерва, иммунизировали 3 % взвесью эритроцитов барана за 5 дней до введения их из эксперимента. Для оценки характера индивидуальных изменений иммунологических показателей при ХБС крыс экспериментальных групп разного возраста исследовали непосредственно перед операцией и через 4 недели после нее. По данным литературы, ХБС после перевязки седалищного нерва сохраняется длительное время (до 56 суток) [21].

Биологический материал для исследований получали в утреннее время суток. Забор крови у мышей проводили из орбитального синуса путем энуклеации глазного яблока; у крыс – из хвостовой вены перед операцией и при декапитации после операции. Для эвтаназии животных применяли передозировку эфира медицинского для наркоза [16].

**Методы исследования.** Уровень в крови тимулина определяли по методу *J. F. Bach* и соавт. [19], который основан на восстановлении чувствительности спонтанных розеткообразующих клеток селезенки тимэктомизированных мышей к азотиоприну. Сыворотку животных пропускали через ультрафильтр *CF-25* фирмы «*Aticon*» (США) для удаления высокомолекулярного ингибитора тимулина. Результаты выражали в виде  $\log_2$  титра гормона.

Выделение лимфоидных органов (тимус, селезенка) проводили общепринятым методом [8]. Тимический индекс (ТИ) и селезеночный индекс (СИ) рассчитывали как отношение их массы (мг) к массе тела. Общее количество ядросодержащих клеток в лимфоидных органах подсчитывали в камере Горяева [11].

Лейкоцитарную формулу периферической крови оценивали общепринятым методом [8].

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов определяли в тесте с частицами латекса [8, 11]. В световом микроскопе подсчитывали не менее 200 макрофагов и определяли фагоцитарное число (ФЧ — количество частиц латекса, поглощенное одним фагоцитирующим макрофагом) и фагоцитарный индекс (ФИ — процент фагоцитирующих клеток).

Для оценки уровня гуморального иммунного ответа мышей иммунизировали внутривенно эритроцитами барана ( $2,5 \times 10^8$  клеток на мышшь) и на 5 сутки после иммунизации определяли в селезенке число антителообразующих клеток (АОК) в реакции локального гемолиза в агарозном геле и уровень антител в сыворотке крови [8, 25, 31]. Подсчитывали количество видимых зон гемолиза на чашку. Результаты представляли в виде относительного количества АОК на  $10^6$  клеток и абсолютного их количества в селезенке. Результаты оценки уровня антител выражали как величину, обратную последнему разведению сыворотки, которое еще агглютинирует эритроциты барана (агглютинины), или вызывает их гемолиз (гемолизины). Результаты исследования титра антител представляли в виде  $\log_2$  титра.

Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в периферической крови определяли методом преципитации в растворе полиэтиленгликоля молекулярной массой 6 кДа [4]. Измерение экстинкции проводили на спектрофотометре  $\mu$ Quant MQX-200 (Biotek, США) при длине волны 450 нм.

У животных определяли массу правого надпочечника (мг), изменения которой является одним из показателей выраженности реакции на стрессовые влияния [12].

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [13]. Значимость различий показателей оценивали по критерию Стьюдента ( $t$ ) (в случае нормального распределения) или по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни ( $U$ ) (в случае отличия распределения от нормального) [5; 13].

**Результаты и их обсуждение. Состояние иммунной системы и надпочечников у мышей разного**

**возраста через 2 недели после моделирования ХБС.** Нами установлено, что у старых мышей уровень тимulina в крови ниже ( $P < 0,05$ ), чем у взрослых мышей (рис. 1). После травмы седалищного нерва уровень тимического гормона существенно повышается в крови взрослых мышей, тогда как у старых животных его значение не изменяется по сравнению с контрольной группой (см. рис. 1). Это привело к возрастному снижению уровня тимulina после моделирования ХБС.

С возрастом масса надпочечника несколько повышается (рис. 2). После травмы нерва у взрослых мышей выявлена тенденция к снижению массы надпочечников, а у старых мышей подопытной группы масса надпочечников практически не изменяется. При этом значения показателя у старых мышей с травмой нерва значительно превышают таковые у взрослых мышей подопытной группы ( $P < 0,05$ ).

У старых мышей существенно снижается масса и клеточность тимуса. Несмотря на возрастное повышение количества перитонеальных макрофагов, фагоцитарная активность макрофагов у старых мышей значительно ниже, чем у взрослых (табл. 1). У взрослых мышей после травмы седалищного нерва показатели относительной массы тимуса и его клеточности уменьшаются в 1,4 раза, селезенки — в 1,2 раза (см. табл. 1). У старых мышей с травмой нерва относительная масса тимуса и его клеточность снижаются в 1,3 раза, а селезенки, наоборот, повышаются, соответственно в 1,1 и 1,2 раза (см. табл. 1). Если у взрослых мышей с травмой седалищного нерва показатели активности перитонеальных макрофагов имеют тенденцию к снижению по сравнению с контролем, то у старых мышей их значения существенно увеличиваются (см. табл. 1).

Значительных изменений лейкоцитарной формулы периферической крови контрольных мышей

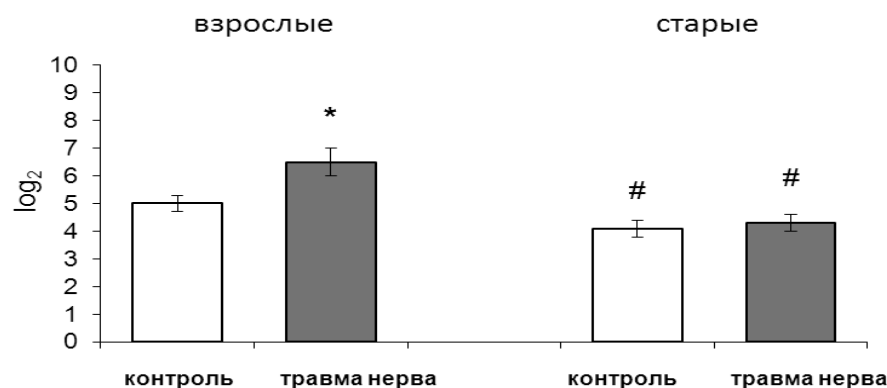


Рис. 1. Титр тимulina в крови мышей разного возраста через 2 недели после травмы седалищного нерва.

\* —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению с контролем; # —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению со взрослыми мышами.

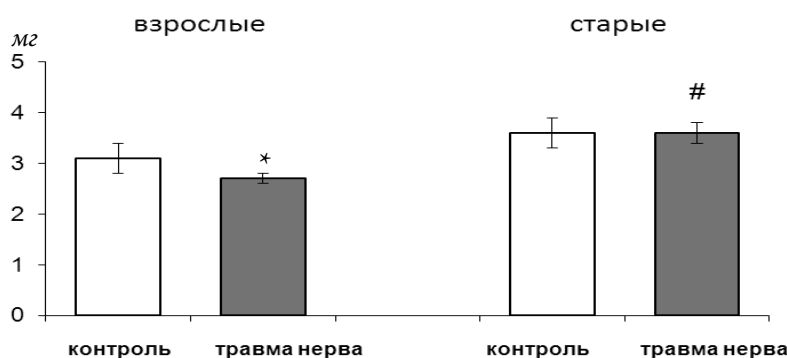


Рис. 2. Масса правого надпочечника у мышей разного возраста через 2 недели после травмы седалищного нерва.

\* —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению с контролем; # —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению со взрослыми мышами.

Таблица 1

Иммунологические показатели у мышей разного возраста через 2 недели после травмы седалищного нерва ( $M \pm m$ )

Показатель	Взрослые мыши		Старые мыши	
	Контроль (n = 8)	Травма нерва (n = 7)	Контроль (n = 7)	Травма нерва (n = 8)
Масса тимуса, мг	22,4 ± 1,6	16,4 ± 3,6	15,1 ± 3,0 <sup>#</sup>	10,8 ± 1,8
ТИ, мг/г, 10 <sup>-3</sup>	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1 <sup>#</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>#</sup>
Клеточность тимуса, ·10 <sup>6</sup>	62,4 ± 8,7	45,2 ± 9,2	28,6 ± 8,6 <sup>#</sup>	22,1 ± 3,6 <sup>#</sup>
Масса селезенки, мг	104,1 ± 11,7	91,2 ± 5,3	148,3 ± 20,4	154,4 ± 29,8 <sup>#</sup>
СИ, мг/г, 10 <sup>-3</sup>	6,1 ± 0,7	5,3 ± 0,3	5,6 ± 0,9	6,1 ± 1,1
Клеточность селезенки, 10 <sup>6</sup>	293,0 ± 30,7	241,3 ± 30,3	295,4 ± 36,9	363,0 ± 31,8 <sup>#</sup>
Количество перитонеальных макрофагов, ·10 <sup>6</sup>	4,9 ± 0,6	5,6 ± 0,8	11,0 ± 2,9 <sup>#</sup>	10,8 ± 2,4
ФИ, %	75,4 ± 2,4	68,4 ± 4,7	61,5 ± 6,3 <sup>#</sup>	75,3 ± 3,4 <sup>#</sup>
ФЧ	6,5 ± 0,5	5,7 ± 0,6	4,8 ± 0,3 <sup>#</sup>	5,8 ± 0,4

Примечания: \* —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению с группой контроля; # —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению со взрослыми мышами соответствующей группы

разного возраста, как и мышей в обеих возрастных группах с травмой нерва по отношению к контрольным группам не обнаружено. Однако при этом обращает на себя внимание возрастная разнонаправленность изменений некоторых показателей формулы крови в подопытных группах. Так, сегментоядерные нейтрофилы у взрослых мышей контрольной группы и с травмой нерва составляют, соответственно (39,1 ± 2,9) % и (43,0 ± 4,9) %; то у старых мышей — (47,0 ± 5,6) % и (36,1 ± 3,5) %, соответственно. Если у взрослых мышей с травмой нерва процент лимфоцитов (46,6 ± 5,2) % и моноцитов (7,9 ± 0,4) % несколько ниже, чем у контрольных мышей (соответственно (49,8 ± 2,8) % и (9,1 ± 1,1) %), то у старых мышей, наоборот, доля этих клеток в группе с травмой нерва несколько выше, чем в контроле — лимфоцитов: (50,6 ± 3,4) % и (40,8 ± 6,1) %, моноцитов: (9,8 ± 0,7) % и (7,8 ± 1,1) %, соответственно. При этом у старых мышей с травмой нерва процент моноцитов в крови существенно превышает таковой у взрослых животных ( $P < 0,05$ ).

Изменение процента эозинофилов в лейкоцитарной формуле является показателем стрессовой реакции, однако как возрастных изменений доли эозинофилов у контрольных мышей (взрослые — (0,9 ± 0,2) %, старые — (1,0 ± 0,4) %, соответственно), так и их изменений в условиях ХБС (взрослые — (1,5 ± 0,6) %, старые — (1,9 ± 0,3) %, соответственно), мы не обнаружили. Возможно, отсутствие существенных изменений количества эозинофилов может быть связано со сроком исследований после моделирования ХБС.

Таким образом, наблюдаются возрастные изменения показателей функционального состояния иммунной системы у контрольных мышей. При этом изменения иммунологических показателей на действие травмы также имеют возрастные отличия. Так, для старых подопытных мышей, по сравнению со взрослыми, характерно не только отсутствие изменений некоторых показателей на повреждение нерва (уровень в крови тимулина), но и менее значительная степень уже имеющихся изменений (масса, клеточность тимуса), а также направлен-

ность изменений (масса селезенки, процент некоторых форменных элементов крови, активность макрофагов). Установленные нами возрастные особенности в функционировании иммунной системы при развитии ХБС могут отразиться на внутрисистемных взаимодействиях и, как результат, на возможности развития адаптивных иммунных реакций в старом организме.

**Состояние иммунной системы у мышей разного возраста через 4 недели после моделирования ХБС.** Известно, что иммунный ответ на чужеродный антиген является интегральным показателем, который отражает кооперативное взаимодействие таких его составляющих, как В-лимфоциты, Т-хелперы, макрофаги [18]. Поэтому на следующем этапе работы мы изучали особенности развития иммунного ответа на введение Т-зависимого антигена (эритроциты барана) у мышей разного возраста в более отдаленные сроки после перевязки седалищного нерва (4 недели).

Нами установлено, что у старых иммунизированных мышей контрольной группы масса и клеточность тимуса, а также уровень антител в крови существенно ниже, чем у взрослых мышей (табл. 2). Не выявлено значительных изменений массы и клеточности тимуса и селезенки у взрослых иммунизированных мышей с травмой нерва, в то время как у старых мышей значения исследованных показателей были существенно ниже, чем у контрольных животных (см. табл. 2). Относительное и абсолютное содержание АОК в селезенке иммунизированных взрослых и старых мышей с травмой нерва снижается по сравнению с контрольными группами, однако, у старых мышей эта разница оказалась больше, чем у взрослых (соответственно, в 5,6 и 6,3 раза против 1,9 и 2,1 раза) (см. табл. 2). После травмы нерва существенное снижение уровня антител в сыворотке крови (гемолизины) было обнаружено только у старых мышей (см. табл. 2).

Следовательно, у старых мышей с травмой седалищного нерва, в отличие от взрослых животных, иммунизация Т-зависимым антигеном приводит к уменьшению массы и клеточности лимфоидных органов. Хотя ХБС сопровождается уменьшением числа АОК в селезенке как у взрослых, так и старых мышей по сравнению с контрольными группами, оно было более значительным у старых мышей и сочеталось со снижением уровня гемолизинов в крови.

**Иммунологические показатели у крыс разного возраста через 4 недели после моделирования ХБС.** При различных воспалительных процессах наблюдается повышение уровня ЦИК в сыворотке периферической крови [14, 15]. Принимая во внимание тот факт, что затяжное течение болевых реакций сочетается с развитием воспалительного процесса, мы определяли ЦИК в сыворотке крови взрослых и старых крыс через 4 нед после перевязки седалищного нерва (рис. 3). Установлено, что концентрация ЦИК в крови старых крыс выше, чем у взрослых. Через 4 недели у крыс с ХБС, независимо от их возраста, наблюдается тенденция к повышению в крови уровня ЦИК по сравнению с контрольными животными. При этом у старых крыс обеих групп показатель значительно выше, чем у взрослых животных.

В лейкоцитарной формуле старых крыс наблюдается повышение процента палочкоядерных нейтрофилов и снижение моноцитов по сравнению со взрослыми животными (табл. 3). При анализе направленности изменений показателей формулы крови у взрослых крыс после травмы нерва выявлен сдвиг в сторону образования сегментоядерных нейтрофилов на фоне отсутствия существенных изменений процента моноцитов. У старых крыс после травмы нерва, как и у взрослых, повышается процент сегментоядерных нейтрофилов. Но в отличие от взрослых крыс, моделирование ХБС

Таблица 2

Показатели иммунной системы у иммунизированных мышей разного возраста через 4 недели после травмы седалищного нерва ( $M \pm m$ )

Показатель	Взрослые мыши		Старые мыши	
	Контроль (n = 8)	Травма нерва (n = 8)	Контроль (n = 8)	Травма нерва (n = 8)
Масса тимуса, мг	14,8 ± 1,6	14,1 ± 1,5	5,9 ± 0,8 <sup>#</sup>	4,2 ± 0,4 <sup>#</sup>
Клеточность тимуса, ·10 <sup>6</sup>	27,5 ± 2,9	25,4 ± 5,4	3,3 ± 0,8 <sup>#</sup>	1,3 ± 0,4 <sup>#*</sup>
Масса селезенки, мг	100,5 ± 6,3	107,2 ± 10,3	84,9 ± 5,7	65,3 ± 3,8 <sup>#*</sup>
Клеточность селезенки, ·10 <sup>6</sup>	189,4 ± 18,0	173,6 ± 24,1	173,5 ± 21,8	141,0 ± 37,6
Относительное количество АОК/10 <sup>6</sup>	205,3 ± 40,2	110,2 ± 17,4 <sup>*</sup>	141,0 ± 37,6	24,8 ± 11,9 <sup>а</sup>
Абсолютное количество АОК, ·10 <sup>3</sup>	38,1 ± 8,7	18,0 ± 3,2 <sup>*</sup>	21,3 ± 4,8	3,4 ± 1,1 <sup>#*</sup>
Титр гемолизинов, log <sub>2</sub>	8,3 ± 0,4	8,7 ± 0,4	5,7 ± 0,4 <sup>#</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>#*</sup>
Титр гемагглю-тининов, log <sub>2</sub>	6,9 ± 0,4	7,4 ± 0,4	4,7 ± 0,6 <sup>#</sup>	6,0 ± 1,0

Примечания: \* —  $P_{(t)} < 0,05$  и <sup>а</sup> —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению с группой контроля данного возраста, <sup>#</sup> —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению со взрослыми мышами соответствующей группы.

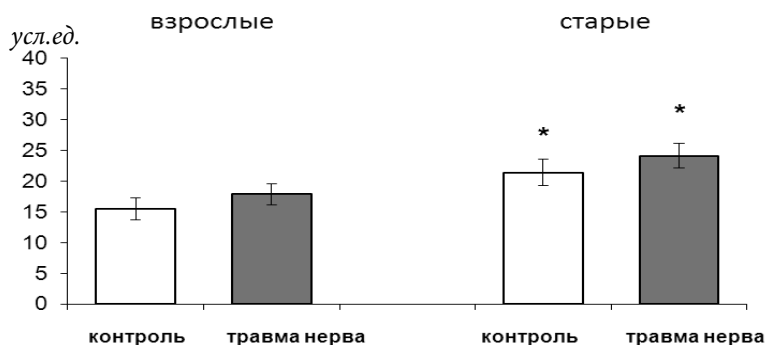


Рис. 3. Уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крыс разного возраста через 4 недели после травмы седалищного нерва. \* —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению со взрослыми крысами.

Лейкоцитарная формула периферической крови у крыс разного возраста до и через 4 недели после травмы седалищного нерва, % ( $M \pm m$ ) Таблица 3

Показатель	Взрослые крысы				Старые крысы			
	Контроль (n = 8)		Травма нерва (n = 8)		Контроль (n = 8)		Травма нерва (n = 8)	
	до	после ложной операции	до	после	до	после ложной операции	до	после
Нейтрофилы								
палочкоядерные	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,4	2,2 ± 0,6	1,5 ± 0,3	3,1 ± 0,2 <sup>а</sup>	2,6 ± 0,4 <sup>а</sup>	3,4 ± 0,4	1,9 ± 0,5*
сегментоядерные	37,9 ± 4,5	43,3 ± 3,9	28,6 ± 3,0	37,6 ± 2,6*	29,1 ± 2,7	37,6 ± 2,7*	24,5 ± 2,9	37,3 ± 4,2*
Базофилы	0,0	0,6 ± 0,2	0,0	0,6 ± 0,4	0,0	0,0	0,14 ± 0,05	0,06 ± 0,02
Эозинофилы	1,0 ± 0,3	3,6 ± 1,0*	0,6 ± 0,6	0,9 ± 0,7 <sup>#</sup>	1,6 ± 0,9	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,8 ± 0,9
Лимфоциты	53,8 ± 4,1	50,0 ± 3,3	50,0 ± 3,3	54,3 ± 3,3	62,8 ± 2,6	53,8 ± 2,5*	66,9 ± 3,0 <sup>а</sup>	54,8 ± 3,6*
Моноциты	5,6 ± 0,6	6,0 ± 0,8	4,4 ± 0,8	5,1 ± 0,6	3,4 ± 0,4 <sup>а</sup>	4,7 ± 0,7	3,6 ± 0,3	4,2 ± 0,7

Примечание: \* —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению с показателем до операции данной группы, <sup>#</sup> —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению с соответствующим контролем (ложная операция), <sup>а</sup> —  $P_{(t)} < 0,05$  по сравнению со взрослыми соответствующей группы.

у старых привело к снижению содержания в крови палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что при старении наблюдаются изменения функционирования центрального и периферического звеньев иммунной системы, а также возрастные особенности реакции этой системы на действие нейропатической боли.

Из данных литературы известно, что у взрослых животных с разными моделями ХБС (в том числе и перевязкой седалищного нерва) в развитие нейропатической боли вовлекаются клетки иммунной системы (нейтрофилы, макрофаги, T-лимфоциты) [36]. Так, циркулирующие зрелые нейтрофилы инфильтрируют нерв уже в ранние сроки после повреждения (первые 24 ч), освобождают в очаге повреждения провоспалительные факторы, которые затем привлекают в очаг и другие клетки, в первую очередь макрофаги. По-видимому, поэтому мы уже не смогли выявить значимых количественных изменений нейтрофилов в периферической крови взрослых мышей через 2 недели после травмы нерва. Мы не исключаем также того, что наблюдаемый у животных сдвиг в сторону уси-

ления образования сегментоядерных нейтрофилов через 4 недели после травмы нерва может отчасти свидетельствовать об изменении динамики между продукцией нейтрофилов и их созреванием.

Мы установили некоторое снижение числа и активности перитонеальных макрофагов на фоне тенденции к уменьшению содержания моноцитов в периферической крови взрослых мышей через 2 недели после травмы нерва. Известно, что макрофаги – ключевые фагоцитирующие клетки в поврежденном периферическом нерве, популяция которых состоит из резидентных клеток и клеток, происходящих из моноцитов крови [26, 36]. Если резидентные макрофаги быстро активируются в ответ на повреждение нерва, то вовлечение в воспалительный процесс циркулирующих клеток моноцитарно-макрофагального ряда требуют активации их клеток-предшественников на уровне костного мозга. Такие циркулирующие клетки под влиянием хемокинов и матрикс металлопротеиназ проходят через гематоневральный барьер в течение первых 2-3-х дней после повреждения нерва, инфильтрируют нерв и синтезируют провоспалительные цитокины (ИЛ-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ ) [7]. Поэтому мы не исключаем возможности того, что установленное

нами изменение на периферии количества клеток моноцитарно-макрофагального ряда через 2 недели после травмы может быть отчасти связано с усилением дифференцировки моноцитов в макрофаги и миграцией последних в зону повреждения нерва.

*T*-лимфоциты — еще один из основных типов клеток иммунной системы, которые активируются при травме периферического нерва [20, 32]. Вовлечение зрелых *T*-лимфоцитов в развитие ХБС доказано в эксперименте с помощью их идентификации в зоне повреждения седалищного нерва. Так, на модели перевязки седалищного нерва показано, что у взрослых мышей *T*-клетки инфильтрируют нерв уже в первые 2-3 сут после его травмы. При этом гипералгезия, вызванная перевязкой седалищного нерва, менее выражена у голых (*nude*) мышей, чем у мышей с наличием тимуса, тогда как пассивный перенос бестимусным мышам зрелых *T*-клеток изменяет их чувствительность к нейропатической боли. Из данной литературы известно о двойственной роли *T*-лимфоцитов, как и макрофагов, при развитии ХБС [30]. Если на первых этапах его развития важны *T*-хелперы 1 типа, синтезирующие провоспалительные цитокины, что усиливает воспаление и гипералгезию, то впоследствии растет вклад *T*-хелперов 2 типа, синтезирующих противовоспалительные цитокины, что способствует снижению воспаления и болевой чувствительности. Поскольку введение *T*-хелперов 1 и 2 типа вызывает противоположный эффект на развитие нейропатической боли, некоторые авторы рассматривают модуляцию *T*-клеточного иммунного ответа как потенциальный подход к коррекции проявлений нейропатической боли [32].

Нами установлено, что у взрослых мышей через 2 недели после повреждения седалищного нерва число тимоцитов снижается в 1,5 раза, что дало основание для предположения о возможной их миграции в очаг повреждения. Более того, учитывая сроки исследования после травмы нерва, мы не исключаем возможности того, что это могут быть *T*-хелперы 2 типа, синтезирующие цитокины с противовоспалительным профилем.

Мы полагаем, что среди факторов, которые способны при ХБС переключать направленность функционирования *T*-лимфоцитов, являются гормоны тимуса. Установленное нами у взрослых мышей значительное повышение уровня в крови тимулина через 2 недели после травмы нерва, по-видимому, направлено на усиление образования и/или активности *T*-хелперов 2 типа, что связано с анальгезирующими, противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами этого гормона [22, 23, 29]. Не исключено также, что тимулин благодаря своим биологическим свойствам (функционирование *T*-хелперов и макрофагов, меж-

клеточное взаимодействие) способствует поддержанию антителообразования через 4 недели после травмы нерва, несмотря на существенное снижение количества АОК в селезенке иммунизированных мышей. Поэтому тимулин можно рассматривать как важный анальгезирующий фактор, который уменьшает неблагоприятное влияние нейропатической боли на развитие адаптивных иммунных реакций во взрослом организме.

Изменение реакции иммунной системы на влияние внутренних и внешних факторов, в том числе и нейропатической боли, может быть связано с возрастным угнетением эндокринной функции тимуса, нарушением ее внутрисистемных функциональных взаимодействий с *T*- и *B*-лимфоцитами, макрофагами, а также с изменением нейроиммуноэндокринных взаимодействий [10, 24]. Так, у старых мышей через 2 недели после повреждения нерва мы не установили повышения в крови уровня тимулина, что могло привести к изменению динамики образования *T*-хелперов разного типа; кроме того, мы регистрировали существенное снижение активности периферических макрофагов. Нами установлено более выраженное падение гуморального иммунного ответа у старых мышей с травмой нерва по сравнению со взрослыми животными с одновременным значительным снижением числа АОК в селезенке и уровня в крови антител. Полученные данные могут быть полезными при планировании и проведении вакцинации, а также оценке ее результативности у старых людей с ХБС. Вместе с тем, необходимо отметить и усиление изменений значений некоторых показателей у старых животных, которые нами установлены через 4 недели после травмы нерва и также могут быть одним из проявлений нарушений иммунных реакций в старом организме.

Возрастные особенности иммунных реакций при развитии ХБС могут быть связаны с нарушением взаимодействий между функционированием тимуса и коры надпочечников [12]. Так, у взрослых мышей, в отличие от старых, в условиях повышения концентрации в крови глюкокортикоидов уровень тимулина снижается. Как нами установлено в данном исследовании, отсутствие повышения уровня тимулина в крови старых мышей с ХБС сопряжено с отсутствием снижения у них массы надпочечника, тогда как у взрослых подопытных мышей активация эндокринной функции тимуса наблюдается на фоне снижения массы надпочечника..

Таким образом, при развитии ХБС функционирование иммунной системы изменяется как у взрослых, так и старых животных, однако эти изменения имеют возрастные особенности. У взрослых животных, в отличие от старых, в условиях действия чужеродных антигенов иммунная реак-

ция на хроническую боль формируется с участием гормонов тимуса, надпочечников и имеет адаптивную направленность. У старых животных с ХБС отсутствие изменений значений иммунологических

показателей либо другая направленность и выраженность их сдвигов могут быть связаны с возрастным нарушением внутрисистемных и иммуноэндокринных взаимодействий.

### Список использованной литературы

1. Абрамов Ю. Б., Козлов А. Ю., Синельщикова О. С. и др. Ноцицептивные реакции при стимуляции иммунитета у крыс с различной индивидуальной устойчивостью к стрессу // Росс.физиол. журн. им. Сеченова.– 2002.– **88**, № 6.– С.599-605.
2. Бондарь Г. В., Черный В. И., Бондарь И. Г. и др. Хронический болевой синдром у онкологических больных. – Донецк, 2011. – 235 с.
3. Введение в биоэтику: Учебное пособие.– М.: Прогресс-Традиция, 1998.– 384 с.
4. Гриневич Ю. А, Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабор. дело.– 1981.– № 8.– С. 493-496.
5. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях.– Л.: Медицина, 1973.– 141 с.
6. Губський Ю. Л, Хобзей М. К. Фармакотерапія в паліативній та хоспісній медицині. Клінічні, фармацевтичні та медико-правові аспекти.– Київ: Здоров'я, 2011.– 352 с.
7. Джелдубаева Э. Р., Чуян Е. Н. Сравнительное исследование анальгетического действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты и анальгина при тонической боли у крыс // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского (Серия «Биология, химия»).– 2006.– **19**, № 1.– С.28-39.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації.– Київ: Авіцена, 2001.– 528 с.
9. Иммунобиология гормонов тимуса.– К.: Здоров'я, 1989.– 160 с.
10. Лабунец И. Эпифиз и ритмы функций иммунной системы при старении. Экспериментальное исследование.– Saarbrücken: Lap Lambert Acad/ Publ., 2012.– 133 с.
11. Лимфоциты. Методы: Пер. с англ.– М.: Мир, 1990.– 395 с.
12. Магдич Л. В., Лабунец И. Ф., Терещина О. П. и др. Возрастные особенности взаимодействия тимуса и коры надпочечников // Пробл. старения и долголетия.–2001.–**10**, № 4.–С. 345-351.
13. Минцер О. П., Угаров Б. Н., Власов В. В. Методы обработки медицинской информации.– К.: Вища школа, 1991.– 271 с.
14. Осипов С. Г., Еремеев В. В., Руднев В. И., Титов В. Н. Методы определения иммунных комплексов (обзор литературы) // Лабор. дело.–1983.– №11.– С. 3-8.
15. Система иммунитета при заболевании внутренних органов.–К.: Здоров'я, 1985.–180 с.
16. Эвтаназия экспериментальных животных: Метод. рекомендации по выведению животных из эксперимента.– М.: МЗ СССР, 1985.– 13 с.
17. Этическая экспертиза биомедицинских исследований: Практ. рекомендации.– М.: Российское общество клинических исследователей, 2005.– 156 с.
18. Ярилин А. А. Основы иммунологии.– М.: Медицина, 1999.– 607 с.
19. Bach J. F., Dardenne M., Bach M. A. Demonstration of a circulation thymic hormone in mouse and in man // Transplant. Proc.–1973.– **1**, № 1.– P. 99-104.
20. Calvo M., Dawes J. M., Bennett D. L. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain // Lancet Neurol.– 2012.– **11**, № 7.– P. 629-642.
21. Dowdall T., Robinson N. I., Meert T. F. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury // Pharmacol Biochem. Behav.– 2005.– **80**, № 1.– P. 93-108.
22. Haddad J, Saade N, Safieh-Garabedian B. Thymulin: an emerging anti-inflammatory molecule // Curr Med Chem.– 2005.– **4**, №3.– P.333-338.
23. Haddad J. J., Hanbali L. H. The anti-inflammatory and immunomodulatory activity of thymulin peptide is NF-kB dependent and involves the downregulation of I kB- $\alpha$  // Am. J. Med. Biol. Res.– 2013.– **1**, №2.– P.41-49.
24. Hirokawa K., Utsuyama M., Makinodan T. Immunity and aging.– Principles and Practice of Geriatric Medicine.– New York: Wiley,2006.– vol. **2**.– P. 19-37.
25. Jerne N. K., Nordin A. A., Henry C. Cell-bound antibodies. – Wistar Institute Press.– 1963.– 109 p.
26. Keifer R., Kieser B. C., Stoll G., Hartung H. P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system // Prog. Neurobiol.– 2001.– **64**, № 2.– P. 109-127.
27. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations and implications for health and disease // Altern. Med. Rev.– 2003.– **8**, № 3.– P. 223-246.
28. Kovacs E. J., Palmer J. L., Fortin C. F. et al. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors // Trends Immunol.– 2009.– **30**, № 7.– P. 319-324.
29. Lunin S. M., Novoselova E. G. Thymus hormones as a prospective anti-inflammatory agents // Expert Opin. Ther. Targets.– 2010.– **14**, № 8.– P.775-786.
30. Machelska H. Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).– 2011.– **59**, №1.– P.11-24.
31. McGregor D. D., Gowas J. L. The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct // J. Exp. Med.– 1963.– **118**, № 2.– P. 303-320.
32. Molem G., Xu K., Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats//Neuroscience.– 2004.– **129**, № 3.– P. 767-777.
33. Panda A., Arjona A., Sapey E. et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age // Trends Immunol.– 2009.– **30**, № 7.– P. 325-333.
34. Pardo J., Schwerdt J. I., Reggiani P. C. et al. Physiology, molecular biology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin // Physiol. Mini Rev.– 2012.– **6**, № 1.– P. 2-12.
35. Reggiani P., Morel G., Console G. et al. The thymus–neuroendocrine axis. Physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin // Ann. N. Y. Acad. Sci.– 2009.– **1153**, № 1.– P.98-106.



36. *Thacker M. A., Clark A. K., Marchand F., McMahon S. B.* Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules // *Anesth. Analg.*– 2007.– **105**, № 3.– P. 838-847.
37. *Weksler M. E., Szabo P.* The effect of age on the B-cell repertoire // *J. Clin. Immunol.*– 2000.– **20**, № 4.– P. 240-249.

Получено 12.06.2016.

## ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ІМУННИХ РЕАКЦІЙ ПРИ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО БОЛЬОВОГО СИНДРОМУ У ТВАРИН

І. Ф. Лабунець, А. Є. Родніченко, Г. І. Парамонова, В. М. Кирик, Н. В. Сикало, В. В. Олар, Г. М. Бутенко, В. В. Безруков

Державна установа «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», 04114 Київ

В досліджах на тваринах різного віку досліджено вплив хронічного (невропатичного) болю на функціональний стан центральної та периферичної ланок імунної системи. Невропатичну біль у дорослих і старих мишей і щурів моделювали шляхом перев'язки сідничного нерва; дослідження проводили через 2 і 4 тижні після травми нерва. Було показано, що при старінні знижується рівень у крові тимуліну, маса та клітинність тимусу, фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів, а також кількість антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці та рівень антитіл у крові тварин, імунізованих еритроцитами барана. Реакція імунної системи на хронічну/невропатичну біль має вікові особливості. Так, у старих мишей після травми нерва, на відміну від дорослих, показники не змінювались (рівень у крові тимуліну), змінювались у меншій (зниження маси і клітинності тимусу) або в більшій мірі (зниження кількості АУК у селезінці, рівень антитіл у крові), а також з іншою спрямованістю (підвищення активності макрофагів). Під впливом хронічного болю спостерігались зміни в лейкоцитарній формулі периферичної крові дорослих щурів; зміни були більш виразними у старих тварин. Обговорюється значення вікових порушень внутрішньосистемних взаємодій в механізмах змін характеру імунних реакцій на хронічну (невропатичну) біль у старому організмі.

## THE AGE-DEPENDENT PECULIARITIES OF ANIMAL IMMUNE SYSTEM REACTIONS UNDER CHRONIC PAIN DEVELOPMENT

I. F. Labunets, A. E. Rodnichenko, G. I. Paramonova, V. M. Kyrick, N. V. Sykalo, V. V. Olar, G. M. Butenko, V. V. Bezrukov

State institution "D. F. Chebotadev Institute of Gerontology NAMS Ukraine" 04114 Kyiv

In the experiments on different age laboratory animals the functioning of body immune system constituents during neuropathic/chronic pain development was investigated. The neuropathic pain state was modeled in young and old mice and rats by sciatic nerve ligation, and central and peripheral components of immune system response were measured. It was shown that in conditions of chronic/neuropathic pain the substantial age-dependent changes in the levels of cell-mediated and humoral immune responses take place. Whereas in adult mice the indexes of body mass, relative mass of thymus, blood thymulin content and the whole thymus cells number did not change substantially after 2 weeks of nerve injury, the corresponding values in old animals were changed and failed drastically after 4 weeks of experiment. Moreover, under the action of nerve ligation the essential shifts in peripheral blood cytology were observed and the latter were more pronounced in older individuals.