

## **ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ БОЛЕВОЙ СТРЕССОРНОЙ НАГРУЗКИ НА ЛИМФОЦИТАРНЫЙ ИНДЕКС ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОСЛЕ АКТИВАЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ БСА И ПОЛНЫМ АДЬЮВАНТОМ ФРЕЙНДА У КРЫС**

**Никенина Е. В.<sup>1,2</sup>, Абрамова А. Ю.<sup>1,3</sup>**

*1 — ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва*

*2 — Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва.*

*3 — Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва.*

В работе изучали влияние болевой стрессорной нагрузки на лимфоцитарный индекс по Шаганину (соотношение лимфоцитов к сегментоядерным нейтрофилам) периферической крови у крыс Вистар с различной прогностической устойчивостью к стрессорной нагрузке. Прогностическую устойчивость к стрессорной нагрузке оценивали в тесте «открытое поле». Активацию иммунных реакций осуществляли подкожным введением бычьего сывороточного альбумина, БСА (в дозе 2,0 мг/кг массы тела в объеме 0,25 мл физиологического раствора) в 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Иммуобилизованные крысы подвергались болевой стрессорной нагрузке через неделю после антигенной стимуляции (или введения физиологического раствора), которая осуществлялась применением в течение 1 часа электрического тока (0,15 мА в стохастическом режиме). Лимфоцитарный индекс по Шаганину (ЛИ) оценивали у крыс в исходном состоянии и через неделю после воздействий. Полученные результаты показали, что в условиях болевого стрессорного воздействия при использовании физиологического раствора отмечали более выраженное снижение ЛИ у прогностически неустойчивых крыс по сравнению с прогностически устойчивыми к стрессорной нагрузке крысами и снижение ЛИ на фоне активации иммунных процессов посредством введения БСА и ПАФ у крыс с разной прогностической устойчивостью к стрессорной нагрузке. Спустя неделю после активации иммунных реакций введением БСА и ПАФ, ЛИ у крыс с разной прогностической устойчивостью к стрессорной нагрузке однотипно. Через неделю после введения БСА и ПАФ крысам с разной прогностической устойчивостью стрессорное болевое воздействие также приводило к достоверному снижению ЛИ у всех групп крыс по сравнению с исходными данными ЛИ. У ПН к стрессорной нагрузке крыс наблюдали более выраженное снижение ЛИ по сравнению с ПУ крысами. Отсюда можно предварительно предположить, что специфические клеточные механизмы иммунной защиты играют здесь более существенную роль, нежели неспецифические факторы.

**Ключевые слова:** болевая стрессорная нагрузка, устойчивость к стрессорной нагрузке, активация иммунных функций, крысы.

### Введение

Болевая стрессорная нагрузка приводит к изменению лимфоцитарного индекса периферической крови у животных, а также сопровождается изменением их функциональной активности (Овсянников В. Г. с соавт., 2008). Выявленные изменения в соотношении лейкоцитов после болевого раздражения носят адаптивный характер (Овсянников В. Г. с соавт., 2008). Антигенная стимуляция сопровождается лимфоцитозом, тогда как болевое стрессорное воздействие у животных приводит к нейтрофилезу и лимфопении (Сотникова Е. Д., 2006). Так, иммобилизационный стресс у собак в течение двух часов приводит к снижению лимфоцитарного индекса по Шаганину на 55%, при болевой стрессорной нагрузке в течение 15 минут ЛИ снижается на 66,7% (Сотникова Е. Д., 2006). Известно, что животные с разной прогностической устойчивостью к стрессу различаются содержанием иммунных факторов в периферической крови (Перцов с соавт., 2009). Также известно, что у крыс с разной прогностической устойчивостью к стрессу содержание лейкоцитов после стрессорной нагрузки различно (Коплик Е. В. с соавт., 2013). При этом, малоизученным остается изменение ЛИ после болевой стрессорной нагрузки на фоне антигенной стимуляции иммунных реакций у крыс с разной прогностической устойчивостью к стрессу.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния болевой стрессорной нагрузки на лимфоцитарный индекс по Шаганину у крыс с различной прогностической устойчивостью к стрессорной нагрузке, подвергнутых стимуляции иммунных реакций.

Методика.

Работа проведена на 64 самцах крыс Вистар массой 250–300 г. При проведении экспериментов руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН (протокол № 1 от 3.09.2005 г.), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA, 2000г.) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (1986 г.).

Структуру целенаправленного поведения у крыс оценивали в тесте «открытое поле» (Коплик Е. Н., 2002 г.). Коэффициент устойчивости к стрессу (КУС) рассчитывали по формуле:

$$\text{КУС} = \sum G(i) / \sum LP(i),$$

где:  $\sum G(i)$  — суммарная горизонтальная активность (пересечение секторов на периферии и в центре открытого поля);  $\sum LP(i)$  — сумма латентных периодов первого движения и выхода в центр открытого поля.

На основании результатов тестирования крыс в тесте «открытое поле» были выделены прогностически неустойчивые (ПН) к стрессорной нагрузке ( $\text{КУС} < 0,8$ ) и прогностически устойчивые (ПУ) к стрессорной нагрузке ( $\text{КУС} > 1,2$ ) особи.

Крысы были разделены на 8 групп по 8 крыс в каждой: 1-я группа — контрольные ПН самцы, введение физ. р-ра, 2-я группа — контрольные ПУ крысы, введение физ. р-ра, 3-я группа — контрольные ПН крысы с болевой стрессорной нагрузкой + физ. р-р, 4-я группа — контрольные ПУ крысы с болевой стрессорной нагрузкой+ физ. р-р, 5-я группа — ПН крысы с активацией иммунных реакций, 6-я группа — ПУ крысы с активацией иммунных реакций, 7-я группа — ПН крысы с болевой стрессорной нагрузкой на фоне активации иммунных

функций, 8-я группа — ПУ крысы с болевой стрессорной нагрузкой на фоне активации иммунных функций.

Пробы периферической крови крыс для оценки лимфоцитарного индекса по Шаганину (ЛИ) получали из хвостовой вены до начала проведения эксперимента, а также после декапитации на 7-е сутки эксперимента. Мазки крови окрашивали методом Романовского-Гимзе. Затем относительное количество лейкоцитов рассчитывали в визуальном поле мазка под световым микроскопом Levenhuk Rainbow D2L, увеличение 100X с использованием иммерсионного масла. ЛИ крови по Шаганину рассчитывали следующим образом:

$$\text{ЛИ} = \text{Л}/\text{Н},$$

где Л — относительное количество лимфоцитов (%), Н — относительное количество сегментоядерных нейтрофилов (%).

Неспецифическую активацию иммунных реакций воспроизводили введением БСА в дозе 2,0 мг/кг массы тела в объеме 0,25 мл физиологического раствора. Раствор БСА смешивали с 0,25 мл ПАФ и полученную взвесь вводили крысам подкожно в трех точках спины. Животным в контрольных (1-я, 2-я, 3-я и 4-я) группах вводили физиологический раствор в аналогичном объеме. Через неделю после введения БСА и ПАФ, животных из 7-ой и 8-ой групп подвергали болевой стрессорной нагрузке в течение 1 часа с одновременным стохастическим электрокожным раздражением током силой 0,15 мА, в течение 30 с через неравные промежутки времени от 3 до 7 минут. Через час после окончания процедуры крыс декапитировали. Крыс из других групп (1,2 и 5,6) декапитировали без стрессорной нагрузки в однотипных условиях.

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью соответствующих статистических и аналитических методов с использованием пакета программ Statistica 6.1.478. Достоверность межгрупповых различий в исходном состоянии между показателями ЛИ у ПН и ПУ крыс выявляли с помощью непараметрического *U*-теста Манна-Уитни. Достоверность различий в динамике между параметрами ЛИ выявляли с помощью непараметрического *T*-критерия Вилкоксона. Числовые данные приведены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего. В связи с вариабельностью ЛИ крови у крыс в исходном состоянии, данный показатель был принят за 100%. Значения ЛИ крови крыс на 7-е сутки эксперимента выражали в % относительно исходного показателя.

### Результаты экспериментов и обсуждение

В исходном (интактном) состоянии показатели ЛИ статистически значимо не отличались у ПН и ПУ к стрессорной нагрузке крыс.

На рисунках представлены изменения ЛИ (соотношений лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов). Через неделю после введения физиологического раствора у самцов крыс каких-либо достоверных изменений ЛИ не было выявлено (рис. 1, 2).

ЛИ у ПН (группа 1) и ПУ (группа 2) к стрессорной нагрузке крыс достоверно не отличались между собой. У контрольных ПН (группа 3) и ПУ (группа 4) крыс после болевой стрессорной нагрузки с электрокожным раздражением ЛИ также достоверно снижался на 81% и 53%, соответственно по сравнению с исходными данными ЛИ ( $p < 0,05$ , рис. 3 и 4 соответственно).

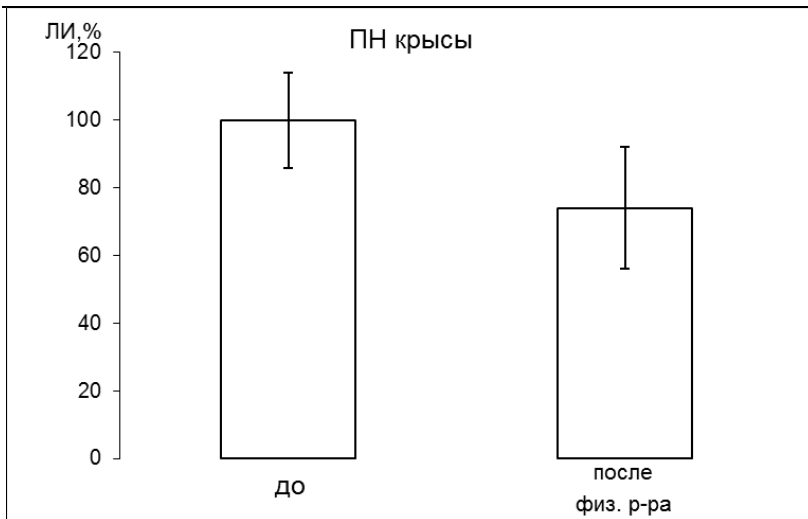


Рис. 1. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после введения физиологического раствора, ПН крысы.

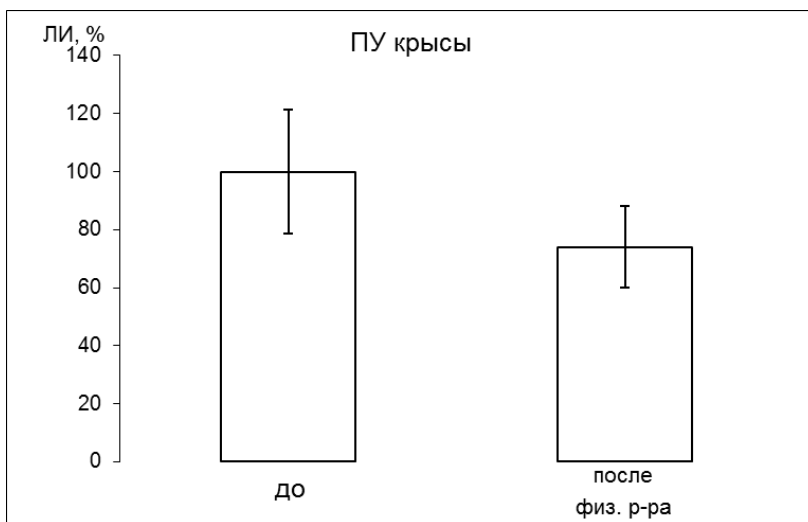


Рис. 2. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после введения физиологического раствора, ПУ крысы.

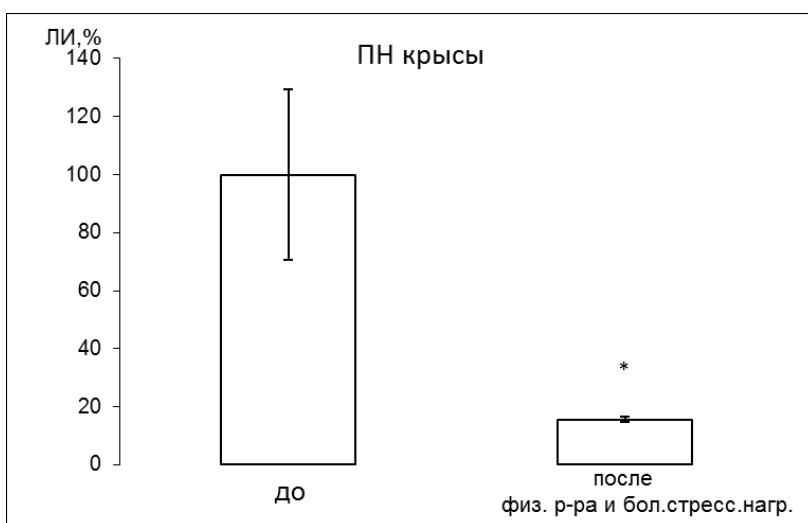


Рис. 3. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после введения физиологического раствора на фоне болевой стрессорной нагрузки, ПН крысы.

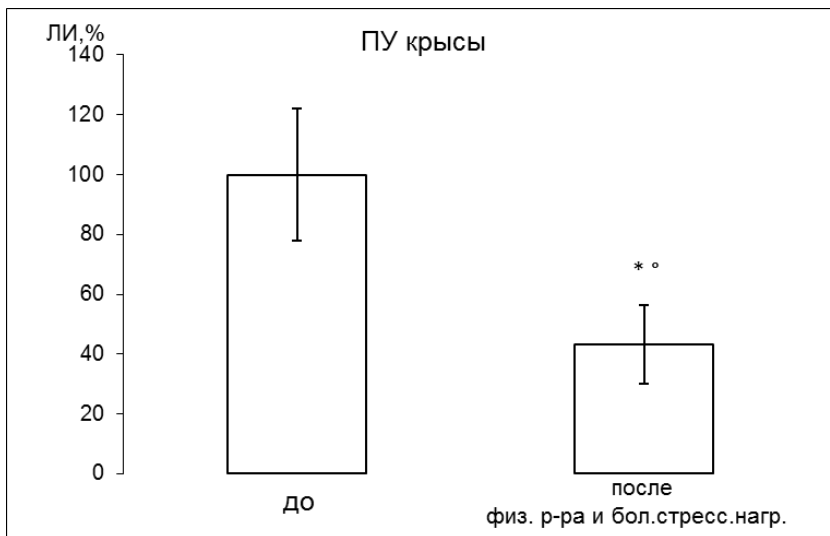


Рис. 4. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после введения физиологического раствора на фоне болевой стрессорной нагрузки, ПУ крысы. \*- достоверно ниже по отношению к исходным значениям ( $p < 0,05$ ), ° - достоверно выше по отношению к ЛИ у ПУ к стрессорной нагрузке крыс ( $p < 0,05$ ).

В межгрупповом сравнении различия ЛИ достоверны. ЛИ у ПУ к стрессорной нагрузке крыс выше, т.е. снижение ЛИ менее выражено, чем ЛИ у ПН к стрессорной нагрузке крыс ( $p < 0,05$ ). Через неделю после введения БСА и ПАФ обнаружено достоверное снижение относительно исходного ЛИ как у ПН (группа 5, на 62%), так и у ПУ (группа 6, на 61%) крыс ( $p < 0,01$ , рис. 5 и 6 соответственно).

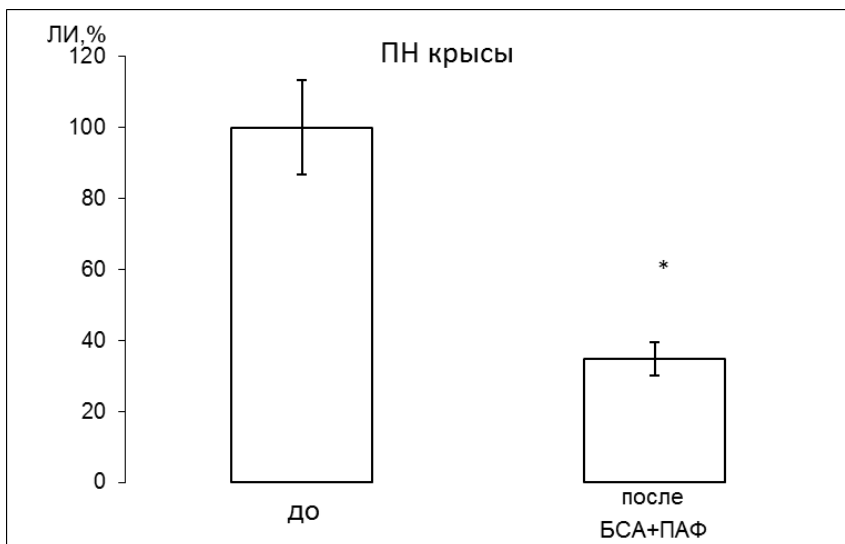


Рис.5. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после введения БСА+ПАФ, ПН крысы. \*- достоверно ниже по отношению к исходным показателям ( $p < 0,05$ ).

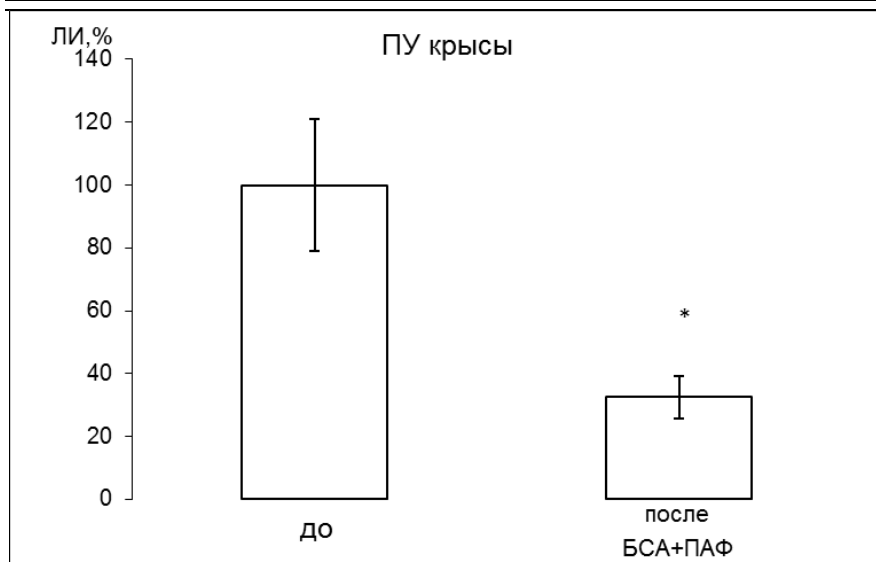


Рис.6. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после введения БСА+ПАФ, ПУ крысы. \*- достоверно ниже по отношению к исходным показателям ( $p < 0,05$ ).

ЛИ у ПН и ПУ к стрессорной нагрузке крыс после введения БСА и ПАФ достоверно не различались между собой. После болевой стрессорной нагрузки с электрокожным раздражением на фоне недельного введения БСА и ПАФ было установлено достоверное снижение ЛИ у ПН (группа 7, на 78%) и ПУ (группа 8, на 65%) крыс по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,05$ , рис. 7 и 8 соответственно).

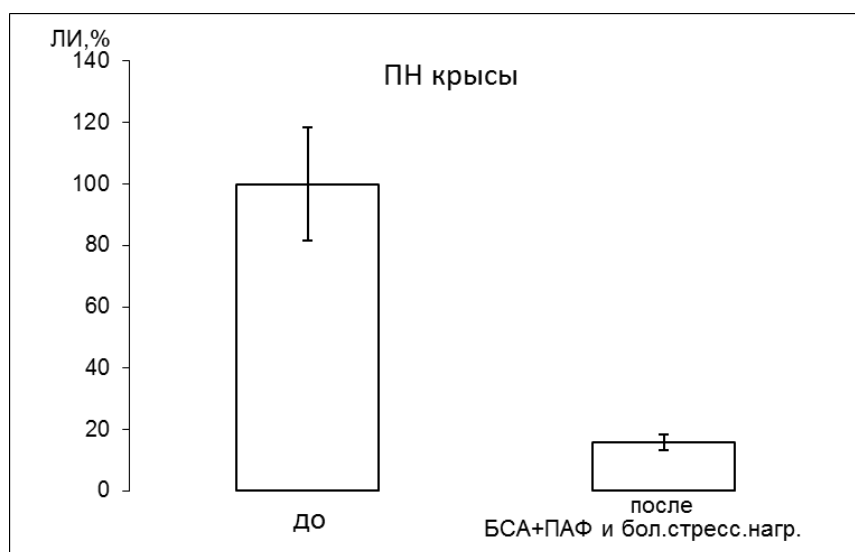


Рис. 7. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после БСА+ПАФ на фоне болевой стрессорной нагрузки, ПН крысы. \* — достоверно ниже по отношению к исходным показателям ( $p < 0,05$ ).

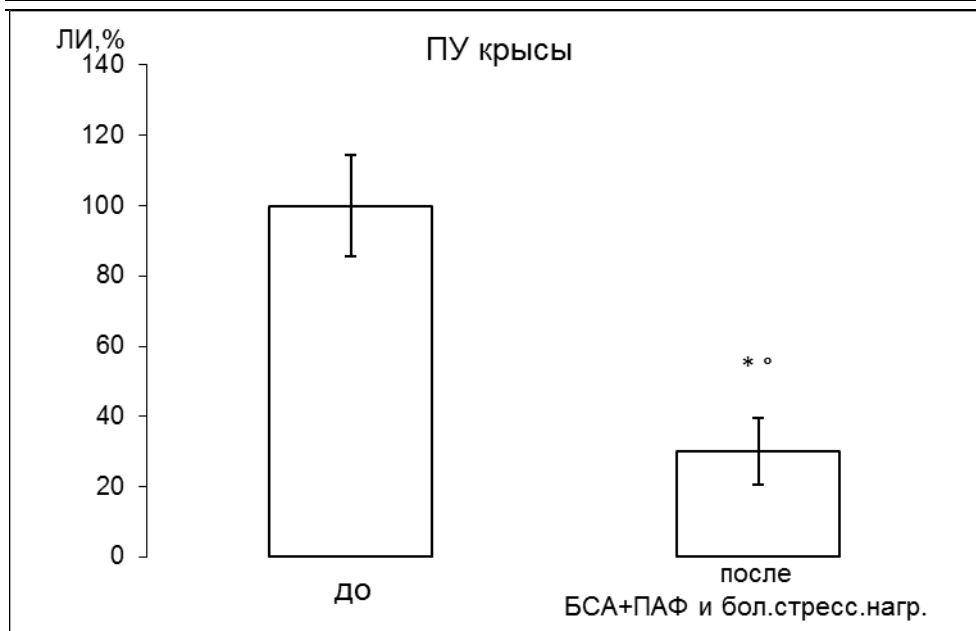


Рис. 8. — Показатели ЛИ до эксперимента и через неделю после БСА+ПАФ на фоне болевой стрессорной нагрузки, ПУ крысы. \*- достоверно ниже по отношению к исходным показателям ( $p < 0,05$ ), °- достоверно выше по отношению к ЛИ у ПН к стрессорной нагрузке крыс ( $p < 0,05$ ).

ЛИ у ПН к стрессорной нагрузке крыс имел достоверные отличия от ЛИ ПУ к стрессорной нагрузке крыс после болевой стрессорной нагрузки и введения БСА и ПАФ. ЛИ у ПН к стрессорной нагрузке крыс был ниже, т.е. снижался более выражено по сравнению с ЛИ ПУ к стрессорной нагрузке крыс.

Таким образом, на фоне применения болевого стрессорного воздействия и физиологического раствора отмечали достоверное снижение ЛИ у всех экспериментальных групп крыс. Причем, у ПУ крыс ЛИ снижался менее выражено по сравнению с исходными данными ЛИ. Более того, установлено достоверное снижение ЛИ как у ПН, так и у ПУ крыс через неделю после введения БСА и ПАФ. Через неделю после введения БСА и ПАФ крысам с разной прогностической устойчивостью стрессорное болевое воздействие также приводило к достоверному снижению ЛИ у всех групп крыс по сравнению с исходными данными ЛИ. У ПН к стрессорной нагрузке крыс наблюдали более выраженное снижение ЛИ по сравнению с ПУ крысами.

Как показали результаты наших экспериментов, у ПН к стрессорной нагрузке крыс ЛИ (соотношение лимфоцитов к зрелым нейтрофилам) снижается более выражено по сравнению с ЛИ у ПУ к стрессорной нагрузке крыс после болевой стрессорной нагрузки как на фоне физиологического раствора, так при активации иммунных реакций введением БСА и ПАФ. Возможно специфические клеточные иммунные реакции, реализуемые лимфоцитами, более выражены у ПУ по сравнению с ПН к стрессорной нагрузке крысами. На фоне активации иммунных функций введением БСА и ПАФ на 7 сутки предположительно также более выраженная активация специфических иммунных функций у ПУ по сравнению с ПН к стрессорной нагрузке крысами.

### Выводы

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что у ПУ к стрессорной нагрузке особой болевой стрессорной нагрузкой (на 7-е сутки с и без активации иммунных

функций) приводит к менее значительному снижению ЛИ по Шаганину, т.е. снижению относительного количества сегментоядерных нейтрофилов, при одновременном увеличении лимфоцитов по сравнению с аналогичными показателями у ПУ к стрессорной нагрузке крыс. Отсюда можно предварительно предположить, что специфические клеточные механизмы иммунной защиты играют здесь более существенную роль, нежели неспецифические факторы.

### Литература

1. Коплик Е. В. и др. // Бюл. exper. биол. мед. — 2013. — №10 — С.419-425
2. Абрамов Ю. Б. // Боль. — 2009. — №4 (25). — С.2-8.
3. Коплик Е. В. // Вестник новых медицинских технологий. — 2002. — Т.9, №1. — С.16-18.
4. Овсянников В. Г., Алексеев В. В., Кутузова А. А. // Вестник Санкт-Петербургского университета. — 2008г. — Т14. — С.44-49.
5. Сотникова Е. Д. // диссертация, Новосибирск. — 2008. — 189с.
6. Перцов С. С., Коплик Е. В., Степанюк В. Л., Симбирцев А. С. // Бюл. exper. биол. мед. — 2009. — Т.148. — №8. — С.161-165.
7. Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2003. — Vol.521. — P.22-39
8. Feng-Li Chen, Yu-Lin Dong, Zhi-Jun Zhang et al. // *Brain Research Bulletin.* — 2011. — Vol 57. — P.1-7.
9. Rittner H. L., H. Machelska and C. Stein // *Journal of Leukocyte Biology.* — 2005. — Vol.78. — P.1215-1222.

### **IMPACT OF EXPOSED PAIN STRESS LOAD ON LYMPHOCYTIC INDEX OF PERIPHERAL BLOOD AFTER ACTIVATION OF IMMUNE REACTIONS BY BSA AND FREUND'S COMPLETE ADJUVANT IN RATS**

**Nikenina E.V.<sup>1,2</sup>, Abramova A.Yu.<sup>1,3</sup>**

*1 — P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow*

*2 — Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow*

*3 — Federal State Budgetary Educational Institution of the Higher Education "A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow*

**Abstract.** In the present work, an effect of pain stress load on the lymphocytic index (LI) by Shaganin (ratio of lymphocytes to segmented neutrophils) of peripheral blood in Wistar rats with different predictive resistance to stress load was studied. This resistance was evaluated in open field test. Activation of immune reactions was done by subcutaneous administration of bovine serum albumin, BSA (in a dose of 2.0 mg/kg of body weight in 0.25 ml of saline solution) in 0.25 ml of complete Freund's adjuvant (CFA). Immobilized rats were subjected to a painful stress load in one week after antigen stimulation (or injection of saline), which was done by applying an electric current (0.15 mA in stochastic mode) during an hour. Shaganin's LIs were evaluated in rats at baseline and in a week after effects. Obtained results suggested that, in conditions of pain stress effect, if using saline solution, more pronounced decrease of LIs in predictably unstable rats compared to one in rats, predictably resistant to stress load, and decrease in LIs with underlying activation of immune



processes by injecting BSA and CFA to rats with different predictable resistance to stress load have been observed. One week after the activation of immune reactions by injecting BSA and CFA, LIs in rats with different prognostic resistance to stress load were the same type. In a week after injecting BSA and CFA to rats with different prognostic resistance, stress pain effect also led to a significant decrease in LIs in all groups of rats, compared to baseline data on LIs. In rats, predictably unstable to stress load, the decrease of LIs was more pronounced in comparison with ones in predictably stable rats. Hence, it can be supposed that specific cellular mechanisms of immune defense play a more significant role here than non-specific factors.

**Keywords:** pain stress load, resistance to stress load, activation of immune reactions, rats

### References

1. Koplík E. V. i dr. // *Bjul. jeksper.biol. med.* — 2013. — №10 — S.419-425
2. Abramov Ju. B. // *Bol'*. — 2009. — №4 (25). — S.2-8.
3. Koplík E. V. // *Vestnik novyh medicinskih tehnologij.* — 2002. — T.9, №1. — C.16-18.
4. Ovsjannikov V. G., Alekseev V. V., Kutuzova A. A. // *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta.* — 2008g. — T14. — S.44-49.
5. Sotnikova E. D. // *dissertacija, Novosibirsk.* — 2008. — 189s.
6. Percov S. S., Koplík E. V., Stepanjuk V. L., Simbircev A. S. // *Bjul. jeksper.biol. med.* — 2009. — T.148. — №8. — S.161-165.
7. Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2003. — Vol.521. — P.22-39
8. Feng-Li Chen, Yu-Lin Dong, Zhi-Jun Zhang et al. // *Brain Research Bulletin.* — 2011. — Vol 57. — P.1-7.
9. Rittner H. L., H. Machelska and C. Stein // *Journal of Leukocyte Biology.* — 2005. — Vol.78. — P.1215-1222.