

И.Г. Брындина, Н.Н. Васильева, М.В. Казакова

**ПЕПТИДЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА***Ижевская государственная медицинская академия (Ижевск)*

*В работе исследовано влияние хронического иммобилизационного стресса на бактерицидную активность альвеолярных макрофагов при односторонней аппликации капсаицина на шейный отдел блуждающего нерва и системном введении аналога лейэнкефалина даларгина. Показано, что стресс сопровождается повышением бактерицидной активности макрофагов. Истощение депо нейропептидов в блуждающем нерве эту активацию устраняет, а даларгин стимулирует дальнейшее увеличение бактерицидной активности макрофагов по сравнению со стрессом.*

**Ключевые слова:** альвеолярные макрофаги, стресс, блуждающий нерв, капсаицин, даларгин

**PEPTIDERGIC MECHANISMS OF REGULATION OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN CONDITION OF EMOTIONAL STRESS**

I.G. Bryndina, N.N. Vasilyeva, M.V. Kazakova

*State Medical Academy, Izhevsk*

*In present work the influence of chronic immobilization stress on bactericidal activity of alveolar macrophages after capsaicin application on the neck division of the right vagus nerve and intramuscular administration of leu-enkephaline analog dalargin was studied. It was shown that stress is accompanied by the increase of macrophagal bactericidal activity whereas the exhausting of neuropeptides deposit in vagus nerve attenuates this activation. Dalargin caused additional augmentation of bactericidal activity of alveolar macrophages in comparison with stress.*

**Key words:** alveolar macrophages, stress, vagus nerve, capsaicin, dalargin

Стресс, индуцированный как физическими, так и психосоциальными стимулами, запускает адаптивную реакцию организма, вовлекающую различные звенья нейроиммуноэндокринного регуляторного аппарата. Реакции иммунной системы на стрессорные стимулы варьируют в зависимости от вида стресса, его длительности, индивидуально-типологических характеристик особей, подвергнутых стрессорному воздействию. Считается, что эустресс мобилизует иммунную систему, тогда как дистресс приводит к угнетению иммунного ответа [4, 5]. Известно, что на функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета влияют гормоны стресса — катехоламины и глюкокортикоиды, а также регуляторные пептиды (лей- и мет-энкефалины, субстанция P), рецепторы которых обнаружены на лимфоцитах, моноцитах и макрофагах [12].

Альвеолярные макрофаги (АМ) - полифункциональные клетки, участвующие как в удалении «отработанного» сурфактанта с поверхности альвеол, так и в защитных реакциях респираторного отдела легких на факторы инфекционной и неинфекционной природы [3]. Показано, что функциональная активность АМ изменяется как при остром [15, 17], так и при хроническом [1] эмоциональном стрессе.

**Целью** данной работы явилось исследование пептидергических механизмов регуляции бактерицидной активности АМ при хроническом иммобилизационном стрессе на фоне истощения депо нейропептидов в капсаицинчувствительных афферентах блуждающего нерва и в условиях системного введения аналога лей-энкефалина даларгина.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Две серии экспериментов выполнены на нелинейных половозрелых белых крысах-самцах массой

180-200 г, содержащихся в стандартной обстановке вивария на обычном рационе. Все процедуры выполнялись в соответствии с правилами проведения работ на экспериментальных животных (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения № 267 от 19.06.2003). В первой серии крысы подвергались многократной иммобилизации в тесных клетках-пеналах по 6 часов ежедневно ( $n = 22$ ). До начала стрессорных воздействий у 12 животных вызывали истощение запасов нейропептидов в капсаицинчувствительных афферентах блуждающего нерва путем аппликации на выделенный в шейном отделе и фиксированный на шпатель нерв (правый) миниатюрного ватного тампона, смоченного в растворе капсаицина в концентрации 10 ммоль/л (10 минут) [2]. Контролем в этой группе служили животные, которым на блуждающий нерв апплицировали изотонический раствор хлорида натрия ( $n = 12$ ). Во второй серии моделью стресса была выбрана ежедневная двухчасовая иммобилизация на спине ( $n = 10$ ). При этом части крыс ( $n = 10$ ) дополнительно вводили даларгин (0,1 мг/кг массы тела животного внутримышечно через каждые 72 часа). Контрольным животным ( $n = 10$ ) вводили изотонический раствор хлорида натрия по той же схеме. Длительность воздействий составляла 10 дней. После окончания опытов животных забивали кровопусканием из сонной артерии под тиопенталовым наркозом, извлекали легкие с трахеей и трижды промывали их изотоническим раствором хлорида натрия (в первой серии опытов каждое легкое промывалось отдельно). Полученные бронхоальвеолярные смывы (БАС) центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут и в осадке, содержащем клетки бронхоальвеолярного лаважа, с помощью стандарт-

ного набора «НСТ-тест» определяли фагоцитарную и бактерицидную активность АМ. Рассчитывали цитологические индексы (ЦИ) — базальный и стимулированный, и индекс активации макрофагов (ИАМ). Результаты подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В первой серии опытов односторонняя аппликация капсаицина на блуждающий нерв приводила к угнетению стимулированной бактерицидной активности АМ в ипсилатеральном легком (табл. 1). Изменения соответствующего показателя на противоположной стороне не были статистически достоверны. Базальная активность клеток не изменялась в обоих легких, а ИАМ понижался билатерально. Хронический иммобилизационный стресс сопровождался возрастанием как базальной, так и стимулированной бактерицидной активности АМ (на 74 % и 13 % соответственно), что свидетельствовало об активирующем влиянии стресса на исследуемые функции этих клеток. ИАМ за счет высокой базальной активности макрофагов понижался в 1,5 раза. Истощение запасов регуляторных пептидов в капсаицинчувствительных афферентах блуждающего нерва приводило к устранению стресс-индуцированного повышения бактерицидной активности АМ. Так, стимулированный ЦИ уменьшался ипсилатерально в 1,9 раза, а базальный ЦИ — в 2,3 раза по сравнению с иммобилизацией, причем, последний был даже достоверно ниже, чем в контроле. В контрлатеральном легком капсаицин также ослаблял стресс-индуцированную активацию макрофагов, однако в гораздо меньшей степени: базальный ЦИ был меньше, чем при стрессе, в 1,2 раза, а стимулированный ЦИ — в 1,3 раза, причем, между соответствующими показателями в правом и левом легком имела место статистически достоверная разница ( $p < 0,001$ ).

Во второй серии экспериментов другая модель стресса вызывала аналогичные изменения изучаемых показателей (табл. 2): увеличивался как ЦИ базальный (на 69 %,  $p < 0,01$ ), так и ЦИ стимулированный (на 56 %,  $p < 0,001$ ), что сопровождалось снижением ИАМ ( $p < 0,05$ ). Введение даларгина на фоне стресса приводило к повышению ЦИ базального как по сравнению с контролем (на 108 %,  $p < 0,001$ ), так и по сравнению со стрессом (на 24 %,  $p < 0,05$ ). При сочетании стресса с инъекциями даларгина повышение ЦИ стимулированного сохранялось, а ИАМ был ниже аналогичного показателя в контроле.

Результаты наших опытов свидетельствуют о том, что бактерицидная активность АМ при хроническом иммобилизационном стрессе повышается, причем имеет место повышение как базальной, так и стимулированной активности АМ. В то же время наблюдается уменьшение ИАМ, что свидетельствует о снижении активационного резерва макрофагов в ответ на специфические стимулы. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что механизмы повышения бактерицидной активности АМ при стрессе могут быть связаны с капсаицинчувствительными афферентами блуждающего нерва. Известно, что в терминалях сенсорных афферентов легких присутствуют субстанция Р, вазоинтестинальный пептид и кокальцигенин, которые высвобождаются при нейрогенной стимуляции [13, 14]. С другой стороны, показано, что плазматические мембраны моноцитов и резидентных макрофагов экспрессируют рецепторы тахикининов [11], а агонисты NK1-рецепторов, в том числе субстанция Р, значительно повышают продукцию в АМ активных форм кислорода и производных арахидоновой кислоты [4, 9, 14].

Известно, что изменение фагоцитарной и цитокин-продуцирующей активности АМ при стрессе может быть вызвано действием нейромедиаторе-

**Таблица 1**

**Бактерицидная активность альвеолярных макрофагов при аппликации капсаицина на блуждающий нерв, иммобилизационном стрессе и их сочетании**

Показатели	Правое легкое			Левое легкое		
	ЦИ базальный	ЦИ стимулированный	ИАМ	ЦИ базальный	ЦИ стимулированный	ИАМ
Контроль (n = 12)	1,63 ± 0,06	2,54 ± 0,01	1,56 ± 0,03	1,61 ± 0,04	2,35 ± 0,01	1,49 ± 0,06
Капсаицин (n = 12)	1,56 ± 0,07	1,88 ± 0,21**	1,19 ± 0,012***	1,55 ± 0,03	1,85 ± 0,5	1,19 ± 0,013***
Стресс (n = 10)	2,63 ± 0,13***	2,87 ± 0,036***	1,05 ± 0,0007***	2,57 ± 0,11***	2,93 ± 0,041***	1,08 ± 0,001***
Стресс + капсаицин (n = 12)	1,14 ± 0,144* ###	1,53 ± 0,147###	1,40 ± 0,108#	2,11 ± 0,12**	2,25 ± 0,12###	1,17 ± 0,03**

**Таблица 2**

**Бактерицидная активность альвеолярных макрофагов при хроническом эмоциональном стрессе и введении даларгина**

Показатели	ЦИ базальный	ЦИ стимулированный	ИАМ
Контроль (n = 10)	1,02 ± 0,1	1,34 ± 0,07	1,33 ± 0,08
Стресс (n = 10)	1,72 ± 0,12 **	2,09 ± 0,09 ***	1,29 ± 0,13
Стресс + даларгин (n = 10)	2,125 ± 0,06 *** #	2,26 ± 0,05 ***	1,09 ± 0,07 *

**Примечание:** \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ### –  $p < 0,001$ , ## –  $p < 0,01$ , # –  $p < 0,05$  по сравнению со стрессом.

ных и гормональных механизмов [7, 10]. Даларгин, являющийся аналогом лейэнкефалина, обладает иммуномодулирующим и стресс-лимитирующим действием [6]. В наших опытах даларгин оказывал дополнительное стимулирующее влияние на бактерицидную активность АМ, что не противоречит полученным ранее данным [16] о стимулирующем влиянии морфина на клетки моноцитарного ряда и угнетающем — на полиморфноядерные лейкоциты.

Не исключено, что влияние хронического стресса на функции АМ может быть обусловлено не только действием глюкокортикоидов, оказывающих главным образом угнетающий эффект как на фагоцитарную, так и на секреторную активность АМ [8, 10]. Немаловажную роль может играть микроокружение, а именно белковые и липидные компоненты сурфактантной системы легких, для которых характерно дифференцированное (как стимулирующее, так и ингибирующее) влияние на активность легочных макрофагов. В наших предыдущих работах была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем фосфолипидов сурфактанта и показателями бактерицидной активности АМ.

Активация АМ повышает защиту респираторного отдела легких от возможного инфицирования в условиях стресса. С другой стороны, активация макрофагов, сопровождаемая продукцией активных форм кислорода, цитокинов и хемотаксических факторов, может явиться одним из механизмов стресс-индуцированных повреждений как альвеолярного выстилающего комплекса, так и легочной паренхимы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Брындина И.Г., Васильева Н.Н., Кривоногова Ю.А. Механизмы регуляции функции альвеолярных макрофагов при хроническом иммобилизационном стрессе // Патогенез. — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 31 — 32.
2. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2001. — Т. 87, № 2. — С. 182 — 203.
3. Клеточная биология легких в норме и при патологии: рук. для врачей / под ред. В.В. Ерохина, Л.К. Романовой. — М.: Медицина, 2000. — 496 с.
4. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. Нейроиммунопатология. — М.: Медицина, 1997. — 283 с.
5. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. — М.: Изд-во ГУНИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 2005. — 160 с.
6. Немтинов П.И., Устименко А.Н., Пашиная Л.Н. Возрастные особенности влияния синтетического аналога лей-энкефалинов (даларгина)

на антителообразующую и пролиферативную активность спленоцитов при остром эмоционально-болевым стрессе у мышей линии СВА/СА // Проблемы старения и долголетия. — 2006. — Т. 15, № 3. — С. 202 — 210.

7. Шишкина Л.Н., Маянский Д.Н., Богомолова М.В. Изучение легочных макрофагов крыс при введении гидрокортизона и адреналэктомии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1987. — № 12. — С. 709 — 711.

8. Belayat F., Meniai K., Michaux C. In vitro effect of glucocorticoids on phagocytic function of sheep alveolar macrophages // Vet J. — 1998. — Vol. 155, N 2. — P. 177 — 181.

9. Boichot E., Germain N., Emonds-Alt X., Advenier C. et al. Effects of SR 140333 and SR 48968 on antigen and substance P-induced activation of guinea-pig alveolar macrophages // Clin. Exp. Allergy. — 1998. — Vol. 28, N 10. — P. 1299 — 1305.

10. Broug-Holub E., Persoons J.H.A., Schornagel K. Effects of Stress on Alveolar Macrophages: A Role for the Sympathetic Nervous System // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1998. — Vol. 19, N 5. — P. 842 — 848.

11. Brunelleschi S., Guidotto S., Viano I. Tachykinin activation of human alveolar macrophages in tobacco smoke and sarcoidosis: a phenotypical and functional study // Neuropeptides. — 1996. — Vol. 30, N 5. — P. 456 — 464.

12. Gaveriaux C., Pelusco J., Simonin F. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcript in immune cells // FEBS Lett. — 1995. — Vol. 369, № 2 — 3. — P. 272-276.

13. Joachim R.A., Cifuentes L.B., Sagach V. Stress induces substance P in vagal sensory neurons innervating the mouse airways // Clin. Exp. Allergy. — 2006. — Vol. 36, N 8. — P. 1001 — 1010.

14. Kaltreider H.B., Ichikawa S., Byrd P.K. Upregulation of neuropeptides and neuropeptide receptors in a murine model of immune inflammation in lung parenchyma // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1997. — Vol. 16, N 2. — P. 133 — 144.

15. Leandro C.G., de Lima T.M., Alba-Loureiro T.C. Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats // Neuroimmunomodulation. — 2007. — Vol. 14, N 1. — P. 4 — 7.

16. Luza J. Effect of morphine on phagocytic activity of the polymorphonuclears and monocytes // Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med. — 1992. — Vol. 134. — P. 47 — 50.

17. Oishi K., Nishio N., Konishi K. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats // Stress. — 2003. — Vol. 6, N 1. — P. 33 — 40.

#### Сведения об авторах

**Брындина Ирина Георгиевна** — заведующая кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281; тел.: 3412-91-82-86 (раб.), факс: 3412-65-81-67; e-mail: bryndina@udm.net)

**Васильева Наталья Николаевна** — доцент кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО ИГМА, кандидат медицинских наук (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281; e-mail: baseg@list.ru)

**Казакова Мария Викторовна** — заочный аспирант кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО ИГМА (426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281)