

ЗМІНИ ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАТУСУ ОРГАНІЗМУ МОЛОДИХ ЩУРІВ РІЗНОЇ СТАТІ ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСУ

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет

імені І. Я. Горбачевського» МОЗ України (м. Тернопіль)

Робота виконана в межах міжкафедральної науково-дослідної роботи ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського» МОЗ України «Патогенетичні закономірності та інформаційні моделі розвитку патологічних процесів за умов дії надзвичайних факторів на організм та їх корекція», № державної реєстрації 0113U001239

Вступ. Стрес постійно супроводжує вагітних жінок, дітей, підлітків [10, 14]. Негативна його дія відображається на поведінці [9], функціонуванні головного мозку [7], ендокринної [11], серцево-судинної [12], імунної систем [13] тощо. Визначення патогенетичних ланок, які б змогли розкрити механізми пошкоджуючого впливу пре- і постнатального стресу в статевому аспекті, допоможе в пошуку профілактичних засобів і лікарських препаратів з протекторними властивостями.

Мета роботи. Вивчити вплив пренатального, постнатального стресу і їх комбінації на імунологічні показники молодих тварин різної статі.

Завдання дослідження. 1. З'ясувати зміни показників циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у молодих щурів за умов різних видів стресу в статевому аспекті. 2. Дослідити зміни імуноглобулінів у тварин різної статі під впливом різних видів стресу.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди виконано на 44 безпорідних статевозрілих щурах-самцях і 49 самицях віком 3 місяці. Пренатальний стрес викликали у вагітних самиць за стандартною методикою [1]: тварин у першій половині дня з 15 по 21 день вагітності протягом години утримували у тисних пластикових пеналах. Після народження тварини перебували у звичайних умовах і стандартному раціоні виварію. До 1 місяця вони були у клітках разом з матір'ю, потім їх розміщували по 10 особин у клітці, в яких вони вільно пересувалися. Постнатальний стрес викликали у тварин, починаючи з 1,5 місячного віку: їх розміщували у клітках з обмеженням життєвого простору до 3-місячного віку. У день експерименту тварин фіксували протягом 1 години спинкою донизу. Комбінований стрес включав у себе вплив пре- і постнатального стресу.

Усі експерименти проводили в першій половині дня в спеціально відведеному приміщенні при

температурі 18-22 °С, відносній вологості 40-60% і освітленості 250 лк. Досліди виконано з дотриманням норм Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 18. 03. 1986 р.), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України №690 від 23. 09. 2009 р. [5, 8].

Евтаназію щурів в усіх експериментах проводили шляхом тотального кровопускання з серця після попереднього тіопентало-натрієвого наркозу (60 мг×кг⁻¹ маси тіла тварини внутрішньочеревно). Для подальшого експериментального дослідження забирали кров. Концентрацію сироваткових імуноглобулінів (Ig) – Ig A, Ig M, Ig G – визначали турбодиметричним методом з використанням напівавтоматичного біохімічного аналізатора «Humalyser 2000» і наборів реактивів фірми «Human» (Німеччина). Вміст ЦІК досліджували за їх реакцією з розчином поліетиленгліколю-6000 [2, 3].

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Excel» («Microsoft», США) та «STATISTICA» 6. 0 («Statsoft», США) з використанням параметричних і непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за критерієм Стьюдента [4], в інших випадках – за допомогою U-критерію Мана-Уїтні.

Результати досліджень та їх обговорення. У контрольних щурів-самців, порівняно із самицями, був вищим на 10,51% вміст ЦІК (таблиці 1, 2). Стрес призводив до зростання циркулюючих імунних комплексів у тварин не залежно від статі і виду викликаного стресу. Найбільше їх зростання у самців відмічено при комбінованому (на 85,48%) і пренатальному (на 74,70%) стресі, найменше – при постнатальному стресі (на 44,49%). Причому при постнатальному стресі показник виявився меншим, ніж отримані значення після впливу пренатального і комбінованого стресу. Це може вказувати на те, що

Таблиця 1

Зміни показників гуморального імунітету (імунологічного статусу), викликані стресом, у щурів-самців

Контроль (n = 10)	Вид стресу		
	Пренатальний (n = 12)	Постнатальний (n = 12)	Комбінований (n = 10)
ЦІК, ум. од.			
77,80 ± 1,46	135,92 ± 2,10* * – p < 0,001	112,42 ± 2,34** * – p < 0,001 ** – p < 0,001	144,30 ± 1,43*** * – p < 0,001 *** – p < 0,001
Ig A, г/л			
0,2536 ± 0,0019	0,6971 ± 0,0112* * – p < 0,001	0,5112 ± 0,0208** * – p < 0,001 ** – p < 0,001	0,5647 ± 0,0146*** * – p < 0,001 *** – p < 0,05
Ig M, г/л			
0,5054 ± 0,0084	0,8707 ± 0,0073* * – p < 0,001	0,7445 ± 0,0122** * – p < 0,001 ** – p < 0,001	0,7384 ± 0,0096* * – p < 0,001
Ig G, г/л			
1,1319 ± 0,0274	1,7214 ± 0,0164* * – p < 0,001	1,4702 ± 0,0183** * – p < 0,001 ** – p < 0,001	1,4562 ± 0,0183* * – p < 0,001

Примітка: 1. * – показники достовірні, порівняно з контролем; 2. ** – показники достовірні, порівняно з пренатальним стресом; 3. *** – показники достовірні, порівняно з постнатальним стресом.

Таблиця 2

Зміни показників гуморального імунітету (імунологічного статусу), викликані стресом, у щурів-самиць

Контроль (n = 10)	Вид стресу		
	Пренатальний (n = 12)	Постнатальний (n = 12)	Комбінований (n = 15)
ЦІК, ум. од.			
70,40 ± 1,00# # – p < 0,001	151,92 ± 2,49*# * – p < 0,001 # – p < 0,001	145,67 ± 3,15*# * – p < 0,001 # – p < 0,001	145,00 ± 2,08** * – p < 0,001 ** – p < 0,05
Ig A, г/л			
0,2632 ± 0,0029# # – p < 0,02	0,6437 ± 0,0071*# * – p < 0,001 # – p < 0,001	0,5799 ± 0,0134**# * – p < 0,001 ** – p < 0,001 # – p < 0,02	0,6576 ± 0,0085***# * – p < 0,001 *** – p < 0,001 # – p < 0,001
Ig M, г/л			
0,4895 ± 0,0075	0,8753 ± 0,0046* * – p < 0,001	0,8154 ± 0,0142**# * – p < 0,001 ** – p < 0,001 # – p < 0,001	0,8324 ± 0,0058***# * – p < 0,001 *** – p < 0,001 # – p < 0,001
Ig G, г/л			
1,1093 ± 0,0095	1,5621 ± 0,0331*# * – p < 0,001 # – p < 0,001	1,5763 ± 0,0172*# * – p < 0,001 # – p < 0,001	1,5368 ± 0,0170*# * – p < 0,001 # – p < 0,01

Примітка: 1. * – показники достовірні, порівняно з контролем; 2. ** – показники достовірні, порівняно з пренатальним стресом; 3. *** – показники достовірні, порівняно з постнатальним стресом; 4. # – показники достовірні, порівняно з самцями.

для імунної системи щурів-самців перенесений пренатальний стрес є найбільш небезпечним.

У щурів-самиць відмічено достовірне зростання ЦІК при всіх видах стресу, відповідно пренатальному – в 2,15 рази, постнатальному – в 2,07 рази і комбінованому – в 2,06 рази. Значно більший негативний вплив спостерігався при пренатальному

стресі, порівняно з комбінованим. Отримані результати вказують на те, що імунна система самиць уразлива до будь-якого впливу стресу.

Виявлено статеву різницю у показниках ЦІК: при пренатальному і постнатальному стресі їх концентрація була статистично достовірно більшою у самиць, порівняно з самцями, а при комбінованому стресі статеві різниці не знайдено. Дані вказують на більше напруження імунної системи самиць при пренатальному і постнатальному стресі, а комбінований стрес небезпечний для молодих тварин обох статей.

При дослідженні концентрації імуноглобулінів у крові виявлено, що в контролі тільки Ig A більше у самиць, порівняно з самцями, а концентрація Ig M та Ig G у здорових інтактних молодих щурів не залежить від статі. Стрес призводив до достовірного зростання концентрації всіх досліджуваних видів імуноглобулінів не залежно від статі і способу викликання стресу.

Як у самців, так і в самиць, спостерігалось найбільше зростання концентрації Ig A. Так, пренатальний стрес призвів до його зростання у самців – у 2,75 рази, самиць – у 2,45 рази, постнатальний, відповідно, у 2,02 і 2,20 рази, комбінований – у 2,23 і 2,50 рази. Тобто, концентрація Ig A зазнала максимальних змін у самців при пренатальному, а у самиць – при пренатальному і комбінованому стресі. Найменші зміни показник мав у самців і самиць при постнатальному стресі. Також виявилось, що значення Ig A при пренатальному стресі вищі у самців, порівняно із самицями, на 8,28 %, а при постнатальному і комбінованому стресі вони більші у самиць – на 11,84 % і 14,13 %. Тобто, результати знов підтверджують те, що пренатальний стрес для щурів-самців є найгіршим, а комбінований – для самиць.

При аналізі концентрації Ig M виявлено, що у самців найбільше зростання показника спостерігалось при пренатальному стресі (в 1,72 рази), а при постнатальному і комбінованому стресі значення зросли, відповідно, в 1,47 і 1,46 рази. У самиць збільшення концентрації Ig M було відповідно в 1,79, 1,67 і 1,70 рази більшим, порівняно з контролем. Тобто дані результати у самиць також вказують на найбільше їх зростання при пренатальному стресі (порівняно з постнатальним значення були більшими на 12,26 %, з комбінованим – на 8,77 %). Статеві різниці відмічена тільки при постнатальному і комбінованому стресі: значення у самиць були більшими відповідно на 8,70 % і 11,30 %. Отримані дані вказують на більші зміни концентрації Ig M

при пренатальному стресі незалежно від статі і більш змін даного імуноглобуліну у самиць.

Концентрація Ig G у щурів-самців найбільше зростала при пренатальному стресі (в 1,52 рази). При постнатальному і комбінованому стресі зміни були більшими в 1,30 і 1,29 рази відповідно. У самиць показник зріс порівняно з контролем в 1,41, 1,42, 1,38 рази і практично не залежав від способу викликаного стресу. В статевому аспекті виявлено, що при пренатальному стресі значення були на 10,20% більшими у самців, порівняно з самицями, а при постнатальному і комбінованому стресі показник був вищим у самиць, відповідно на 6,74% і 5,24%. Отже, пренатальний стрес виявився знов найгіршим для самців, а постнатальний і комбінований – для самиць.

Згідно літературних даних зростання циркулюючих імунних комплексів може вказувати на ураження колагену судин, імуноглобулінів – на розвиток аутоімунних захворювань, підгострих і хронічних

інфекцій, хронічних захворювань печінки, захворювань сполучної тканини [6]. Очевидно, що у молодих тварин, які зазнали стресу, відмічено напруження імунного статусу організму і створюються передумови для розвитку даних захворювань.

Висновок. 1. Пренатальний, постнатальний стрес і їх поєднана дія призводить до напруження імунної системи організму молодих щурів самців і самиць. 2. Найнесприятливішим для самців є пренатальний стрес, який спричинює найбільше зростання циркулюючих імунних комплексів, імуноглобулінів класів А, М, G. Імунна система самиць уразлива до будь-якого виду стресу, що спричинює у них дизрегуляторні зміни.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому буде вивчено морфологічні особливості коронарних судин, тимусу, печінки, надниркових залоз, яєчників для виявлення змін, які можуть бути обумовлені дисфункцією імунної системи.

Література

1. Абрамов А. В. Состояние толерантности к глюкозе у самцов, перенесших хронический пренатальный стресс / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник, М. А. Тихоновская // Запорожский медицинский журнал. – 2004. – № 6. – С. 38-41.
2. Белозеров Е. С. Преципитационный метод исследования иммунных комплексов у больных вирусным гепатитом В / Е. С. Белозеров, Т. А. Макарова // Лабораторное дело. – 1982. – № 12. – С. 37-39.
3. Гаєвська М. Ю. Циркулюючі імунні комплекси за умов норми та патології / М. Ю. Гаєвська // Вісник наукових досліджень. – 2000. – № 4. – С. 37-40.
4. Клінічна та лабораторна діагностика. Нормативні директивні правові документи. – К.: МВЦ «Медінформ», 2003. – 856 с.
5. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А. – Київ: Авіцена, 2002. – 156 с.
6. Чиркин А. А. Клинический анализ лабораторных данных / А. А. Чиркин. – М.: Мед. лит., 2010. – 384 с.
7. Effect of prenatal stress on density of NMDA receptors in rat brain / Tavassoli E., Saboory E., Teshfam M. [et al.] // Int. J. Dev. Neurosci. – 2013. – Vol. 31 (8). – P. 790-795.
8. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 56 p.
9. Exogenous prenatal corticosterone exposure mimics the effects of prenatal stress on adult brain stress response systems and fear extinction behavior / Bingham B. C., Sheela Rani C. S., Frazer A. [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2013. – Vol. 38 (11). – P. 2746-2757.
10. Exposure to prenatal psychobiological stress exerts programming influences on the mother and her fetus / Sandman C. A., Davis E. P., Buss C., Glynn L. M. // Neuroendocrinology. – 2012. – Vol. 95 (1). – P. 7-21.
11. Harris A. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease / Harris A., Seckl J. // Horm. Behav. – 2011. – Vol. 59 (3). – P. 279-289.
12. Prenatal maternal bereavement and congenital heart defects in offspring: a registry-based study / J. L. Zhu, J. Olsen, H. T. Sørensen [et al.] // Pediatrics. – 2013. – Vol. 131 (4). – P. 1225-1230.
13. Psychological stress in children may alter the immune response / E. Carlsson, A. Frostell, J. Ludvigsson, M. Faresjö // J. Immunol. – 2014. Vol. 192 (5). – P. 2071-2081.
14. The association between perceived emotional support, maternal mood, salivary cortisol, salivary cortisone, and the ratio between the two compounds in response to acute stress in second trimester pregnant women / La Marca-Ghaemmaghami P., La Marca R., Dainese S. M. [et al.] // J. Psychosom. Res. – 2013. – Vol. 75 (4). – P. 314-320.

УДК 612.017.1-02:616.45-001.1/.3]-055-092.9

ЗМІНИ ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАТУСУ ОРГАНІЗМУ МОЛОДИХ ЩУРІВ РІЗНОЇ СТАТІ ПІД ВПЛИВОМ СТРЕСУ

Денефіль О. В., Міц І. Р.

Резюме. У досліджах було досліджено вплив пренатального, постнатального стресу і їх комбінації на імунну систему статевозрілих щурів 3-місячного віку. Виявлено, що будь-який із способів викликаного стресу призводить до напруження імунної системи організму молодих щурів самців і самиць. Найнесприятливішим для самців є пренатальний стрес, який спричинює найбільше зростання циркулюючих імунних комплексів, імуноглобулінів класів А, М, G. Імунна система самиць уразлива до будь-якого виду стресу, що спричинює у них дизрегуляторні зміни.

Ключові слова: стрес, щурі самці та самиці, імунна система.

УДК 612. 017. 1-02:616. 45-001. 1/. 3]-055-092. 9

ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА МОЛОДЫХ КРЫС РАЗЛИЧНОГО ПОЛА ПОД ВЛИЯНИЕМ СТРЕССА

Денефиль О. В., Миц И. Р.

Резюме. В опытах было исследовано влияние пренатального, постнатального стресса и их комбинации на иммунную систему половозрелых крыс 3- месячного возраста. Выявлено, что любой из способов вызванного стресса приводит к напряжению иммунной системы организма молодых крыс самцов и самок. Наиболее неблагоприятным для самцов является пренатальный стресс, который вызывает максимальный рост циркулирующих иммунных комплексов, иммуноглобулинов классов А, М и G. Иммунная система самок уязвима к любому виду стресса, который вызывает у них дизрегуляторные изменения.

Ключевые слова: стресс, крысы самцы и самки, иммунная система.

UDC 612. 017. 1-02:616. 45-001. 1/. 3]-055-092. 9

Stress-Induced Changes of the Immunological Status of Young Rats of Both Sexes

Denefil O. V., Mits I. R.

Abstract. The paper considers separate and combined effect of prenatal and postnatal stress on the immunological values of young rats of both sexes.

Experiments were performed on 44 mongrel sexually mature male rats and on 49 females aged 3 months. Pregnant females were kept for one hour in narrow plastic cages in the first part of the day within 15-20 gestation days to induce prenatal stress. The neonatals were kept on standard vivarium dietary intake. Postnatal stress was induced in young animals since 1.5 months' age by keeping them in cramped cages till 3 months' age. On the experimental day, the rats were fixed supine for one hour. Combined stress included the effect of pre-and postnatal stress.

The concentration of serum immunoglobulins (Ig) – IgA, IgM, IgG and the content of circulating immune complexes (CIC) were determined.

Digital data were statistically processed with "Excel" ("Microsoft, USA) and "STATISTICA" 6.0 ("Statsoft", USA) using parametric and non-parametric methods of data evaluation.

In control male rats, the CIC content was by 10.51 per cent higher ($p < 0.001$) than in females. The stress impact resulted in growing CIC irrespective of the sex and stress type. The maximum growth for males was found under combined (85.48 per cent, $p < 0.01$) and prenatal (74.70 per cent, $p < 0.001$) stress. The females revealed reliable CIC growth under prenatal (2.15 times, $p < 0.001$), postnatal (2.07 times, $p < 0.001$) and combined stress (2.06, $p < 0.001$). Under the prenatal and postnatal stress, the CIC concentration was reliably higher in females in comparison with male rats whereas no sexual difference was found under combined stress.

The study of blood Ig concentration revealed higher IgA level in females in comparison with male rats (by 3.65 per cent, $p < 0.02$) whereas the concentration of IgM and IgG in young intact rats proved to be sex-independent. The stress led to reliable growth in concentration of all Ig types irrespective of the sex and the way of stress induction.

If compared to the rest of immunoglobulins, the IgA showed the highest concentration growth both in male and female rats. The prenatal stress resulted in 2.75 times growth ($p < 0.001$) in males and 2.45 times ($p < 0.001$) – in females, the values for the postnatal and combined stress being 2.02 ($p < 0.01$) and 2.20 ($p < 0.001$); 2.23 ($p < 0.001$) and 2.50 ($p < 0.001$), respectively.

Thus, the prenatal stress accounted for the maximum changes of the IgA concentration in male rats whereas in females the peak changes occurred as a result of the prenatal and combined stress. On the contrary, the postnatal stress was found to cause the least concentration changes both in males and females.

The male rats revealed the highest IgM concentration growth under the prenatal stress (1.72 times, $p < 0.001$) whereas the postnatal and combined stress resulted in 1.47 times ($p < 0.001$) and 1.46 times ($p < 0.001$) growth, respectively. In females, the IgM concentration growth was found to be 1.79 ($p < 0.001$), 1.67 ($p < 0.001$) and 1.70 ($p < 0.001$) times higher in comparison with the controls. The sex difference was noted under the postnatal and combined stress only, the values for the females being by 8.70 per cent ($p < 0.001$) and by 11.30 per cent ($p < 0.001$) higher, respectively.

The male rats revealed the highest IgG concentration growth under the prenatal stress (1.52 times, $p < 0.001$). Under the postnatal and combined stress, the concentration increased 1.30 ($p < 0.001$) and 1.29 ($p < 0.001$) times, respectively. In females, the value increased 1.41 ($p < 0.001$), 1.42 ($p < 0.001$) and 1.38 times ($p < 0.001$) as compared with the controls and proved to be virtually irrespective of the way of stress induction. In the aspect of sex difference, under the prenatal stress the growth values were by 10.20 per cent ($p < 0.001$) higher in the male rats as compared with the females, while under the postnatal and combined stress the value was found to be higher in the females (by 6.74 per cent, $p < 0.001$ and 5.24 per cent, $p < 0.001$, respectively).

Thus, the prenatal and postnatal stresses as well as their combined effect result in the immune system tension of young male and female rats. The prenatal stress causing the highest growth of CIC and IgA, IgM and IgG concentration, is the most unfavorable for the males. The females' immune system is vulnerable to any stress that causes disregulatory changes.

Key words: stress, rats males and females, immune system.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 8. 05. 2014 р.