

НЕЙРОЭНДОКРИННАЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗИМОЗАНОВОМ ПЕРИТОНИТЕ *

Ю.И. Шилов, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;
Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера;
Пермский государственный национальный исследовательский университет*

С.Ю. Шилов, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;
Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера;*

С.Ю. Барков, *Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е.А. Вагнера*

Я.А. Туляев, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

В.П. Котегов, *Пермский государственный национальный исследовательский университет*

Т.А. Баева, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;*

Н.А. Шилова, *Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е.А. Вагнера;*

Для цитирования:

Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Барков С.Ю., Туляев Я.А., Котегов В.П., Баева Т.А., Шилова Н.А. Нейроэндокринная и фармакологическая регуляция функций фагоцитирующих клеток при экспериментальном зимозановом перитоните // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2021. – № 2. – С. 15–26.
<https://doi.org/10.7242/2658-705X/2021.2.2>

В эксперименте на неинбредных белых крысах обоего пола исследовали влияние острого стресса в условиях фармакологической блокады периферических бета-адренорецепторов надололом на количественный состав, поглотительную активность и ацидификацию фагосом фагоцитирующих клеток, продукцию ими активных форм кислорода при зимозановом перитоните, иммуномодулирующее действие по тем же показателям дегидроэпиандростерона, влияние кастрации на половой диморфизм воспалительного ответа фагоцитирующих клеток, половые различия стрессорных изменений воспалительного ответа и влияние на них половых стероидных гормонов, иммуномодулирующее действие нестероидного противовоспалительного лекарственного средства на основе (Z)-3-(2-оксо-2-(4-толил)-этилиден)пиперазин-2-она в сравнении с диклофенаком натрия на функции фагоцитирующих клеток при развитии зимозанового перитонита.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-44-59095-р_а «Нейроэндокринная и фармакологическая регуляция функций фагоцитирующих клеток при экспериментальном зимозановом перитоните» и Администрации Пермского края.

Проведенные исследования открывают ряд новых направлений для выяснения механизмов нейроэндокринной регуляции функций фагоцитирующих клеток при воспалении, разработки методических подходов для экспериментальной доклинической оценки новых лекарственных средств с использованием современных инструментальных методов.

Ключевые слова: зимозановый перитонит, воспаление, фагоцитирующие клетки, иммунная система, стресс, адренергические соединения, половые стероидные гормоны, дегидроэпандростерон, половой диморфизм иммунной системы, новые нестероидные противовоспалительные лекарственные средства.

Введение

Зимозановый перитонит как экспериментальная модель острого стерильного воспаления в настоящее время начинает привлекать внимание все большего числа исследователей, т.к. отличается воспроизводимостью и отражает развитие всех основных событий при воспалении. Так, в Национальной библиотеке медицины Национального института здоровья США PubMed-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) при поиске на ключевые слова «zymosan and peritonitis» в 2017 г. найдено 356 публикаций (первая публикация датируется 1977 г.), а к 2020 г. – уже 1 416 статей. Зимозан как нерастворимый полисахарид клеточной стенки грибов *Saccharomyces cerevisiae* является классическим PAMP (англ.: pathogen-associated molecular pattern или патоген-ассоциированный молекулярный паттерн), который взаимодействует с паттернраспознающими рецепторами: дектином-1 (бета-глюканраспознающий рецептор), TLR2, а также активирует белки системы комплемента по альтернативному механизму, что и приводит к развитию острого воспалительного ответа [8, 10].

В связи с возможностью дозирования зимозана как флоггенного агента в большом диапазоне модель позволяет воспроизводить не только локальный, но и тяжелый системный воспалительный ответ. В ней можно исследовать последовательную миграцию в очаг воспаления основных клеточных эффекторов врожденного иммунитета – нейтрофилов, моноцитов и

эозинофилов, оценивать участие в развитии воспаления тучных клеток, локальной и системной продукции цитокинов и низкомолекулярных медиаторов воспаления [9, 11]. Хотя экспериментальная модель зимозанового перитонита широко используется для оценки противовоспалительного действия новых лекарственных средств, в большинстве работ авторы часто ограничиваются оценкой лишь количества клеток в экссудате без оценки их функций, лишь в единичных работах эта модель используется для выяснения патогенеза заболеваний, например сахарного диабета [11]. Учитывая ведущую роль фагоцитирующих клеток как основных эффекторов при развитии воспаления, дальнейшее расширение возможностей экспериментальной модели зимозанового перитонита представляется нам в использовании дифференцированной оценки функций фагоцитов, в том числе с применением современных автоматизированных инструментальных методов.

В связи с тем, что наш коллектив занимается проблемами нейроэндокринной регуляции функций иммунной системы (работы были инициированы в 1976 г. заслуженным деятелем науки РФ, профессором Н.Н. Кеворковым), в частности механизмами участия в регуляции клеток иммунной системы половых стероидных гормонов, тиреоидных гормонов, эндогенных опиатов, адренергических соединений и др., более того, сформулирована концепция об единой нейроэндокринноиммунной системе [1], представлялось актуальным исследование участия нейроэндокринных

механизмов в регуляции функций фагоцитирующих клеток при воспалении с использованием экспериментальной модели зимозанового перитонита у крыс.

В прикладном плане являлось важным исследование иммуномодулирующего действия нового нестероидного противовоспалительного лекарственного средства на основе (Z)-3-(2-оксо-2-(4-толил)-этилиден)пиперазин-2-она, синтезированного сотрудниками химического факультета ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет».

Цель настоящей работы – исследование нейроэндокринной и фармакологической регуляции функций фагоцитирующих клеток при экспериментальном зимозановом перитоните.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования выполнены на самцах и самках нелинейных белых крыс. Всех животных содержали в условиях вивария на стандартной диете (со свободным доступом к пище и воде) и стандартном освещении (12 ч света и 12 ч темноты). Все исследования проводили в соответствии с международным соглашением об экспериментах на животных.

В первой серии исследований на неинбредных белых крысах-самцах средней массой 200,5 г оценивали динамику изменения количественного состава фагоцитирующих клеток перитонеального экссудата, их поглотительной активности и ацидификации фагосом по интенсивности свечения поглощенного зимозана, меченого рН-сенситивным флуорохромом зеленым рHrodo™, кислородзависимой микробицидности в реакции люминолзависимой хемилюминисценции. Для индукции перитонита животным вводили стерильную суспензию зимозана А (*Zymosan A from Saccharomyces cerevisiae*, Fluka) внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела. Для приготовления суспензии 100 мг зимозана суспендировали в 4 мл изотонического официального раствора хлорида натрия, прогревали по-

лученную суспензию в течение 60 мин на кипящей водяной бане, после чего взвесью диспергировали на ультразвуковой бане и на Vortex-Genie 2™ (Scientific Industries, США). Контрольным крысам вместо суспензии зимозана вводили официальный изотонический раствор хлорида натрия.

Животных выводили из эксперимента через 4, 12, 21 и 72 ч от момента введения флогогена под наркозом. Проводили: 1) оценку гематологических параметров, а также количественного состава лейкоцитов перитонеального смыва микроскопическими методами и с помощью гематологического анализатора ABX micros 60 (Horiba Diagnostics ABX); 2) оценку поглотительной активности и ацидификации фагосом перитонеальных клеток крыс с использованием зимозана, меченого зеленым рHrodo™, с помощью проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) по ранее описанному методу [2, 3, 6]; 3) исследование кислородзависимой микробицидности клеток методом люминолзависимой хемилюминисценции с использованием люминометра Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems.

Перитонеальные фагоциты выделяли методом промывания брюшной полости 20 мл среды 199 с добавлением 20 ЕД/мл гепарина. После двукратного отмывания центрифугированием и подсчёта абсолютного числа лейкоцитов в камере Нейбауэра (AC1000 Improved Neubauer, Hawksley, Великобритания) их концентрацию доводили до 25×10^6 клеток в 1 мл в полной питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 без L-глутамина с добавлением 2 мМ GlutaMAX™, 1 мМ пирувата натрия, 1% заменимых аминокислот в MEM (все Gibco®, Life technologies™), 10 мМ HEPES (Sigma-Aldrich). В пробирках Эппендорф объёмом 0,2 мл смешивали 88 мкл ППС, 4 мкл суспензии лейкоцитов (25×10^6 клеток/мл) и 8 мкл преинкубированной для опсонизации при 37°C в течение 30 мин смеси равных объёмов частиц зимозана, меченого зеленым рHrodo™ (100×10^6 частиц/мл; рHrodo™

Green Zymosan Bioparticles™ Conjugate for Phagocytosis, Thermo Fisher Scientific, P35365) и аутоплазмы.

Параллельно ставили пробы с неопсонизированными частицами (вместо аутоплазмы вносили ППС), а также негативные контрольные пробы без объектов фагоцитоза (аутофлуоресценция) и без лейкоцитов. Пробы инкубировали при 37°C в течение 120 мин, после чего пробирки помещали на лед и их содержимое количественно переносили в плоскодонные 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия), используя для отмывания и увеличения объема каждой пробы по 100 мкл охлажденного до 4°C раствора Версена (Биолот, Россия) с рН, доведенной до 7,4.

Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью планшетного проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Hayward, CA, США), который позволяет непосредственно оценить абсолютное количество клеток на микролитр без использования эталонных частиц благодаря применению стандартизированного микрокапилляра и высокоточного микроасоса (The Lee Company, США).

Далее данные анализировали в программе Guava CytoSoft 5.3, где в модулях Guava ExpressPlus и Guava Express PRO проводили последовательное гейтирование гистограмм, полученных с датчика переднего светорассеяния (Forward Scatter) по количеству флуоресцентных событий по датчику Green Fluorescence. При этом все отгейтированные клетки объективно отражают уровень ацидификации фагосом, так как при физиологических значениях рН вне клетки green pHodo™ не флуоресцирует, и интенсивность флуоресценция прямо пропорциональна снижению рН до 4,0-4,5 при ацидификации фагосом. Результаты выражали в виде числа флуоресцирующих событий, которое отражает общее число клеток с ацидифицированными фагосомами.

Кислородзависимую микробицидность перитонеальных фагоцитирующих клеток оценивали методом люминолзависимой хемилюминесценции. В стимулированном

варианте в лунке планшета (3915 Assay Plate 96 Well Flat bottom Black Polystyrene, Corning Inc. Costar) смешивали 70 мкл раствора Хенкса без фенолового красного, 10 мкл натриевой соли люминола (Luminol sodium salt, Sigma, США, A4686-1G) на растворе Хенкса (конечная концентрация 2×10^{-4} М), 10 мкл клеток перитонеального смыва (25×10^6 /мл) и 10 мкл опсонизированного или неопсонизированного зимозана (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). В спонтанном варианте смешивали те же компоненты, но вместо зимозана вносили 10 мкл раствора Хенкса. Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo LabSystems (тип измерения – kinetic, integration time – 1000 ms, интервал – 3 мин, meas. count – 60) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU).

Во второй серии исследований оценивали влияние острого стресса на эти же показатели при 21-часовом перитоните в условиях введения антагониста периферических бета-адренорецепторов надолола. Для моделирования общего адаптационного синдрома использовали экспериментальную модель 24-часового иммобилизационного стресса (иммобилизация животных в положении на спине в пластиковых restrейнерах (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) в сочетании с дозированной кровопотерей (трехкратное взятие по 1,5 мл крови из сосудов хвоста в момент начала иммобилизации, через 6 и 24 ч от ее начала). Для фармакологической блокады периферических бета-адренорецепторов за 30 мин до начала иммобилизации животным вводили внутривенно 0,25% раствор надолола (Sigma-Aldrich, N1892, США) на официальной воде для инъекций в дозе 5 мг/кг массы тела однократно. Выраженность стрессорной перестройки метаболизма и ее отмены надололом контролировали по изменению уровня глюкозы периферической крови в динамике эксперимента. Изменения гематологических показателей

оценивали общепринятыми методами. Для экспериментального моделирования мобилизации фагоцитирующих клеток при воспалении использовали модель 21-часового зимозанового перитонита. Животным вводили стерильную суспензию зимозана (*Zymosan A from Saccharomyces cerevisiae*, Fluka) внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела (в группах со стрессом суспензию зимозана вводили через 3 ч от начала 24-часовой иммобилизации).

В третьей серии экспериментов исследовали изменения вышеперечисленных показателей в условиях 12-часового перитонита при старении самцов крыс и регуляторного воздействия дегидроэпиандростерона у старых животных. Дегидроэпиандростерон (Sigma-Aldrich, кат. D 4000) вводили старым животным (старше 1,5 лет) подкожно через день (всего 4 инъекции по 2 мг/кг массы тела, последнее введение за 24 ч до конца эксперимента). Контролем служили крысы того же возраста, получавшие по той же схеме растворитель дегидроэпиандростерона (официальное оливковое масло). За 12 ч до окончания эксперимента животным вводили стерильную суспензию предварительно прогретого в течение 60 мин на кипящей водяной бане зимозана А внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг. Животных выводили из эксперимента под наркозом.

В четвертой серии экспериментов исследовали влияние орхидэктомии на половой диморфизм воспалительного ответа фагоцитирующих клеток при экспериментальном зимозановом перитоните и половые различия стрессорных изменений воспалительного ответа фагоцитирующих клеток. Операцию орхидэктомии проводили общепринятым методом под наркозом за 2 месяца до основного эксперимента. Для моделирования общего адаптационного синдрома использовали модель 24-часового иммобилизационного стресса (иммобилизация животных в положении на спине в пластиковых рестрейнерах (ООО «НПК Открытая Наука», Россия). Для индукции перитонита животным вво-

дили стерильную суспензию зимозана А внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела (животным с иммобилизационным стрессом зимозан вводили через 3 ч от начала иммобилизации). Животных выводили из эксперимента под наркозом через 21 ч после индукции воспаления.

В пятой серии экспериментальных исследований проводили оценку иммуномодулирующего действия нестероидного противовоспалительного лекарственного средства на основе (Z)-3-(2-оксо-2-(4-толил)-этилиден)пиперазин-2-она в сравнении с диклофенаком натрия на функции фагоцитирующих клеток при развитии зимозанового перитонита у крыс. Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых неинбредных крыс средней массой 181 г. Все животные были разделены на 6 групп.

Животным *первой группы* вводили нестероидное противовоспалительное лекарственное средство на основе (Z)-3-(2-оксо-2-(4-толил)-этилиден)пиперазин-2-она внутрижелудочно однократно натошак в 2% крахмальной слизи в дозе 15 мг/кг массы тела. Крысы *второй группы* аналогичным способом получали это же средство в дозе 75 мг/кг массы тела. Животным *третьей группы* однократно внутрижелудочно натошак в 2% крахмальной слизи вводили диклофенак натрия (эталон сравнения, официальный препарат в таблетках, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, производства STADA АО «Нижфарм», Россия, Нижний Новгород, ГСП-459, ул. Солганская, д. 7, Серия 0220918) в дозе 15 мг/кг массы тела. Крысам *четвертой группы* (основной контроль) вводили однократно внутрижелудочно натошак 2% крахмальную слизь в дозе 0,5 мл/кг массы тела животного. У животных пятой группы (дополнительный контроль) индуцировали зимозановый перитонит без предварительного введения препаратов. Развитие перитонита у всех животных этих пяти групп индуцировали внутрибрюшинным введением стерильной суспензии зимозана А на официальном изотоническом растворе

хлорида натрия в дозе 50 мг/кг массы тела через 1 ч после введения нестероидных противовоспалительных средств или крахмальной слизи. Крысам 6-й группы (дополнительный контроль) вместо суспензии зимозана внутривентриально вводили изотонический раствор хлорида натрия. Животных выводили из эксперимента под наркозом через 4 ч после индукции воспаления. Оценивали изменения функций фагоцитирующих клеток с помощью тех же методов, что и в первой серии экспериментов.

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, апостериорного критерия Дункана (post-hoc Duncan's test) для множественного сравнения между группами, парного и непарного *t*-критерия Стьюдента для двух выборок. Различия или показатели связи считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании динамики изменения функций фагоцитирующих клеток при экспериментальном зимозановом перитоните у крыс установлено, что общее число ядросодержащих клеток повышается уже через 4 ч после введения зимозана и остается повышенным в течение всего срока исследования (рис. 1).

Через 4 ч после индукции воспаления в экссудате статистически значимо повышается число нейтрофильных гранулоци-

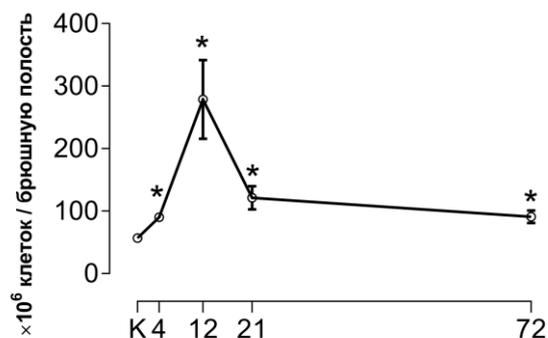


Рис. 1. Динамика числа ядросодержащих клеток в перитонеальном экссудате. По оси абсцисс: К – контрольная группа; 4, 12, 21 и 72 – срок после введения зимозана, ч. * – $p < 0,05$ к контролю по критерию Дункана

тов (рис. 2). Максимальное увеличение количества нейтрофилов отмечается через 12 ч, а через 21 и 72 ч этот показатель не отличается от контроля (см. рис. 2).

Число лимфоцитов в экссудате начинает повышаться в более поздние сроки – через 12, 21 и 72 ч, в то время как в ранние сроки воспаления (через 4 ч) оно снижается (см. рис. 2). Статистически значимое повышение количества мононуклеарных фагоцитов отмечается через 72 ч от начала воспаления (см. рис. 2). В целом полученные результаты соответствуют двум первым стадиям по закону клеточной эмиграции И.И. Мечникова.

На рис. 3 представлены данные по изменению кислородзависимой микробицидности в реакции люминолзависимой хемилюминесценции с неопсонизированным зимозаном. В этих условиях активация фагоцитирующих клеток связана с первичным распознаванием через паттернраспознающие рецепторы. Прежде всего, обращает на себя внимание повышение показателей спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции через 4 ч после индукции воспаления, что связано с активацией фагоцитов в условиях *in vivo*. В пробах с добавлением зимозана во всех трех концентрациях отмечается статистически значимое повышение продукции активных форм кислорода через 4 и 12 ч.

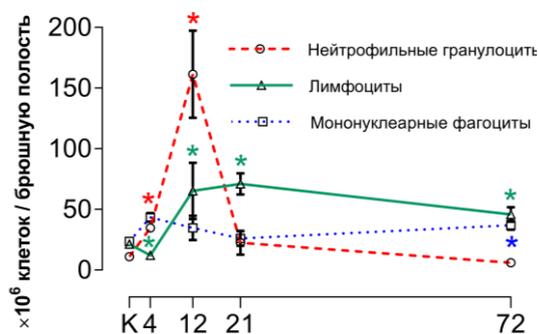


Рис. 2. Динамика числа нейтрофильных гранулоцитов, мононуклеарных фагоцитов и лимфоцитов в перитонеальном экссудате. По оси абсцисс: К – контрольная группа; 4, 12, 21 и 72 – срок после введения зимозана, ч.

* – $p < 0,05$ к контролю по критерию Дункана

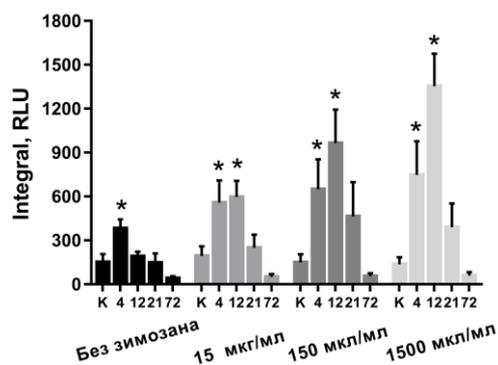


Рис. 3. Динамика показателей люминолзависимой хемилюминисценции с неопсонизированным зимозаном в разных концентрациях при зимозановом перитоните. По оси абсцисс: К – контрольная группа; 4, 12, 21 и 72 – срок после введения зимозана, ч. * – $p < 0,05$ к контролю по критерию Дункана

Несколько иные закономерности отмечаются при оценке ответа на опсонизированный зимозан (рис. 4). Активация фагоцитирующих клеток в этих условиях связана с распознаванием iC3b-фрагмента комплемента (CR3 и CR4) и Fc-фрагментов антител [4]. При добавлении опсонизированного зимозана в концентрациях 15 и 150 мкг/мл в сравнении с контролем отмечается статистически значимая активация через 12 ч, в то время как при концентрации 1500 мкг/мл наблюдается статистически значимая супрессия продукции активных форм кислорода через 21 и 72 ч.

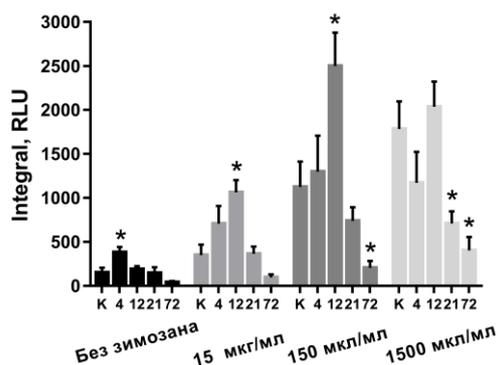


Рис. 4. Динамика показателей люминолзависимой хемилюминисценции с опсонизированным зимозаном в разных концентрациях при зимозановом перитоните. По оси абсцисс: К – контрольная группа; 4, 12, 21 и 72 – срок после введения зимозана, ч. * – $p < 0,05$ к контролю по критерию Дункана

Через 72 ч выраженная супрессия ответа отмечается и в концентрации 150 мкг/мл. Это может указывать на переход воспаления в стадию разрешения. Показано, что в этих условиях активируются процессы эффероцитоза и продукция M2-макрофагами низкомолекулярных метаболитов – резолвина и простагландина E₂ [7].

При исследовании фагоцитарной активности лейкоцитов перитонеального экссудата по отношению к зимозану, меченому pH-сенситивным флуорохромом green pHrodo™, выявлена ее статистически значимая стимуляция (рис. 5). Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимых отличий между пробами с опсонизированным и неопсонизированным зимозаном. В связи с тем, что длительность контакта фагоцитов с объектами фагоцитоза *in vitro* в наших экспериментах составляет 120 мин (именно это время требуется для созревания и ацидификации фагосом), статистически значимые различия показателей числа светящихся событий в пробах с опсонизированным зимозаном в сравнении с неопсонизированным отсутствуют. С учетом того, что по данным микроскопического анализа, максимальный уровень поглощения зимозана (плато) достигается уже через 30 мин, при инкубации в течение 120 мин фактор влияния лиганд-рецепторной адгезии объ-

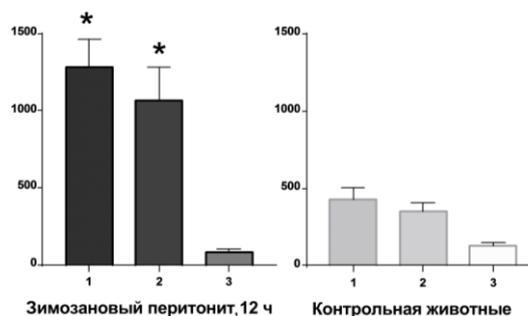


Рис. 5. Изменение среднего числа флуоресцирующих событий в пробах с опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, меченым pHrodo™, на высоте развития зимозанового перитонита. По оси абсцисс: 1 – опсонизированный зимозан; 2 – неопсонизированный зимозан; 3 – лейкоциты. * – $p < 0,05$ к контролю соответствующего показателя по непарному t-критерию Стьюдента

ектов фагоцитоза к мембране фагоцита становится несущественным. Число светящихся событий в этих условиях отражает количество клеток с фагосомами, подвергшимися ацидификации.

На рис. 6 суммированы основные закономерности, выявленные в 1-й серии исследований, и их возможный механизм.

Суммируя результаты этой части работы, можно сделать следующее заключение.

- Экспериментально обоснована возможность моделирования острого неинфекционного воспаления в брюшной полости у крыс.

- Предлагаемая экспериментальная модель воспаления характеризуется использованием для индукции этого типового патологического процесса стандартного флогогенного агента, являющегося химически охарактеризованным биотехнологическим компонентом клеточной стенки грибов – зимозаном А.

- Развивающийся в предлагаемой модели воспалительный ответ характеризуется умеренной выраженностью, вовлечением в воспаление фагоцитирующих клеток и их фазной активацией.

- Предложенный вариант модели зимозанового перспективен для исследования механизмов нейроэндокринной и фармакологической регуляции воспаления.

Учитывая ранее полученные нашим коллективом данные об участии изменения функциональной экспрессии бета-адренергических рецепторов под действием глюкокортикоидных гормонов, в том числе при остром стрессе [5, 12, 13], в следующем разделе работы проведено исследование влияния острого стресса на функции фагоцитирующих клеток при 21-часовом перитоните в условиях введения антагониста периферических бета-адренорецепторов надолола. Для моделирования общего адаптационного синдрома использовали модель 24-часового иммобилизационного стресса в сочетании с дозированной кровопотерей. Для фармакологической блокады периферических бета-адренорецепторов за 30 мин до начала иммобилизации животным вводили внутривенно 0,25% раствор надолола (Sigma-Aldrich, США) в дозе 5 мг/кг массы тела однократно.

Установлено, что в использованной экспериментальной модели острого стресса у животных, подвергнутых стрессу без введения надолола, уже через 30 мин от начала иммобилизации развивается статистически значимое повышение уровня глюкозы, максимально выраженное в течение первых 6 ч от начала иммобилизации. Введение надолола на

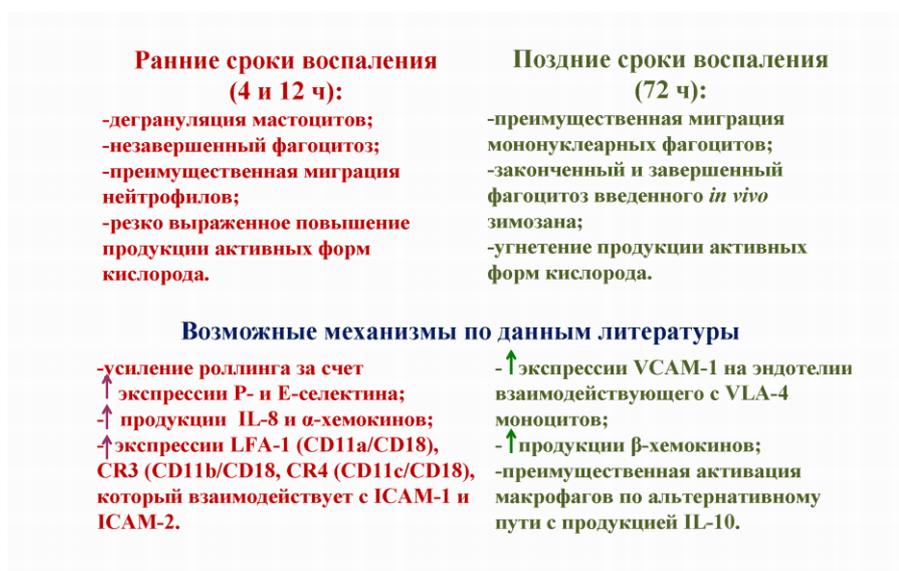


Рис. 6. Основные закономерности, выявленные при исследовании динамики функций фагоцитирующих клеток при зимозановом перитоните

фоне стресса полностью отменяет развитие стрессорной гипергликемии, концентрация глюкозы при этом не отличается от показателей исходного фона и нестрессированных крыс контрольной группы ($p>0,05$).

В связи с тем что в качестве экспериментальной модели острого стресса выбрана 24-часовая иммобилизация крыс в положении на спине в сочетании с дозированной кровопотерей, представлялось необходимым оценить изменения числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в динамике эксперимента. Установлено, что дозированная кровопотеря приводит через 24 ч от начала иммобилизации к снижению концентрации гемоглобина,

одинаково выраженному у животных, подвергнутых только стрессу, и у крыс, подвергнутых стрессу на фоне введения надолола ($p>0,05$ между группами). В связи с этим ее можно рассматривать как дополнительный фактор стрессорного воздействия. Установлено, что острый стресс не влияет на общее содержание числа лейкоцитов в перитонеальном экссудате. При стрессе на фоне введения надолола количество ядросодержащих клеток в экссудате статистически значимо повышается (рис. 7).

Как видно из рис. 8, при остром стрессе продукция активных форм кислорода в реакции люминолзависимой хемилюми-

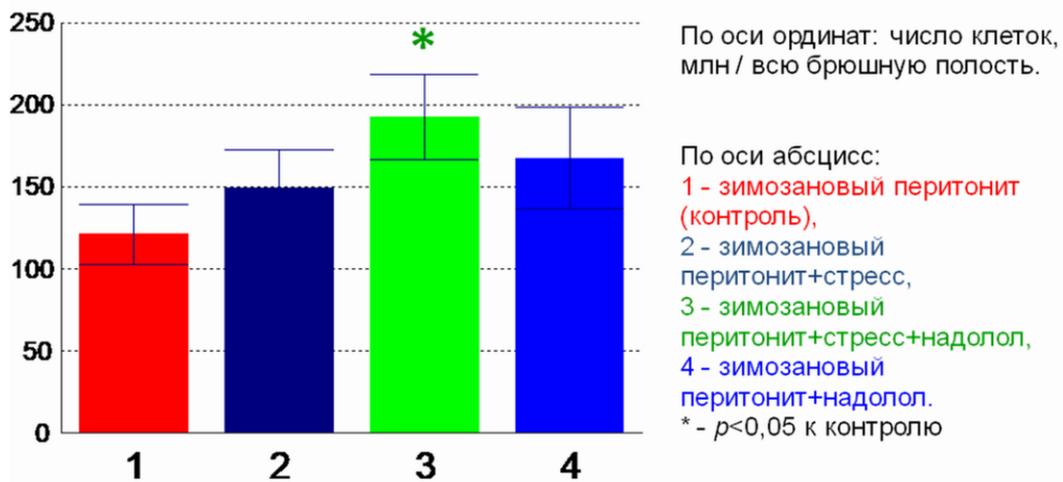


Рис. 7. Изменение общего числа перитонеальных клеток при зимозановом перитоните на фоне стресса и введения надолола

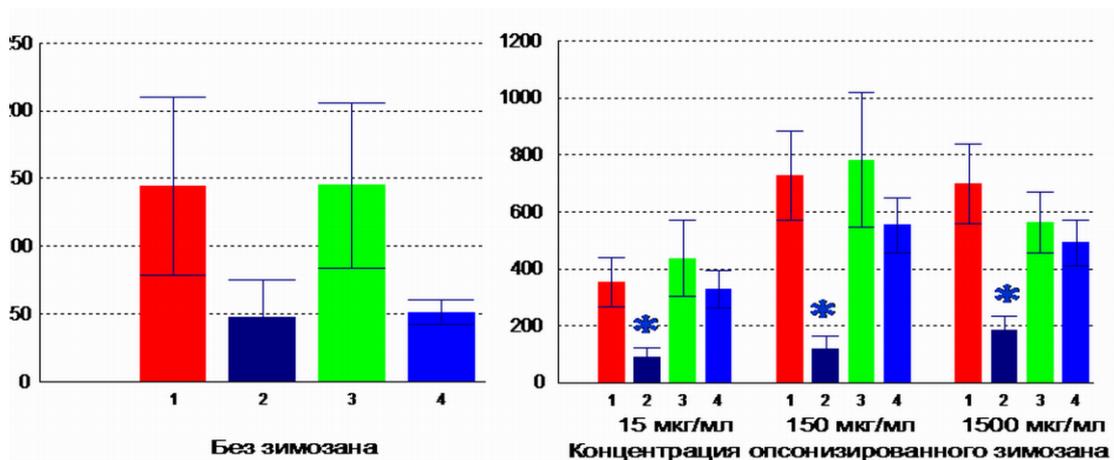


Рис. 8. Изменение показателей люминолзависимой хемилюминесценции с перитонеальными клетками при зимозановом перитоните на фоне стресса и введения надолола. По оси абсцисс: 1 - зимозановый перитонит (контроль), 2 - зимозановый перитонит+стресс, 3 - зимозановый перитонит+стресс+надолол, 4 - зимозановый перитонит+надолол. По оси ординат: интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU) / 250000 перитонеальных клеток. * - $p<0,05$ к контролю

несценции с опсонизированным зимозаном статистически значимо снижается. При введении надолола этот эффект отменяется. Введение надолола нестрессированным животным не влияет на показатели люминолзависимой хемилюминесценции. Экспериментальные воздействия не влияют на уровень спонтанной хемилюминесценции.

Полученные результаты указывают на важную роль сигналов с периферических бета-адренорецепторов, функциональная экспрессия которых повышается при стрессе под действием глюкокортикоидов, в супрессии воспалительной мобилизации фагоцитирующих клеток при развитии зимозанового перитонита.

В третьей серии экспериментов оценивали иммуномодулирующее действие дегидроэпандростерона на функции фагоцитирующих клеток при 12-часовом зимозановом перитоните у старых крыс. Установлено, что у старых самцов крыс в сравнении с молодыми отмечается усиление воспалительного ответа через 12 ч после индукции зимозанового перитонита, проявляющееся в статистически значимом повышении показателей кислородзависимой микробицидности перитонеальных фагоцитирующих клеток в спонтанном и стимулированном опсонизированным зимозаном вариантах реакции люминолзависимой хемилюминесценции. При введении дегидроэпандростерона старым крысам выявлен выраженный противовоспалительный эффект, проявляющийся в статистически значимом снижении показателей реакции люминолзависимой хемилюминесценции как в спонтанном, так и в стимулированном опсонизированным зимозаном вариантах реакции.

Таким образом, введение дегидроэпандростерона старым крысам приводит к выраженному снижению показателей люминолзависимой хемилюминесценции перитонеальных клеток при развитии зимозанового перитонита.

При исследовании влияния орхидэктомии на половой диморфизм воспалительного ответа фагоцитирующих клеток при

экспериментальном зимозановом перитоните и половых различий стрессорных изменений воспалительного ответа фагоцитирующих клеток (четвертая серия экспериментов) установлено, что у самок крыс при индукции перитонита в период максимальной физиологической продукции эстрогенов (фаза проэструса эстрального цикла) в сравнении с самцами отмечается значительно более высокая продукция активных форм кислорода клетками перитонеального экссудата и лейкоцитами крови, проявляющаяся в статистически значимом увеличении интегральных показателей реакции люминолзависимой хемилюминесценции в пробах как с опсонизированным, так и с неопсонизированным зимозаном, а также спонтанной продукции активных форм кислорода в пробах без стимулятора. Поглощительная активность и уровень ацидификации фагосом, оцениваемые с помощью флуоресцентного маркера зеленого pHrodoTM, выше у самок крыс в сравнении с самцами.

Орхидэктомия приводит к повышению продукции активных форм кислорода клетками перитонеального экссудата и лейкоцитами крови по интегральным показателям люминолзависимой хемилюминесценции, а также их поглощительной активности и ацидификации фагосом, что нивелирует половые различия и указывает на участие андрогенов в формировании полового диморфизма воспалительного ответа. Выявлен половой диморфизм стрессорных изменений функций перитонеальных фагоцитов, проявляющийся в значительной супрессии продукции активных форм кислорода в пробах с опсонизированным зимозаном у самцов, но не у самок крыс. Орхидэктомия отменяла эти изменения.

В пятой серии экспериментальных исследований проведена оценка иммуномодулирующего действия нестероидного противовоспалительного лекарственного средства на основе (Z)-3-(2-оксо-2-(4-толил)-этилиден)пиперазин-2-она в сравнении с диклофенаком натрия на функции фагоцитирующих клеток при развитии зимозанового перитонита у крыс. Живот-

ных выводили из эксперимента под наркозом через 4 ч после индукции воспаления. Установлено, что нестероидное противовоспалительное лекарственное средство на основе (Z)-3-(2-оксо-2-(4-толил)-этилиден)пиперазин-2-она дозозависимо снижает продукцию активных форм кислорода в реакции люминолзависимой хемилюминесценции, миграцию нейтрофилов в очаг воспаления. По выраженности противовоспалительного действия на этой модели воспаления новое противовоспалительное средство не только не уступает диклофенаку натрия, но и оказывает статистически более выраженный супрессивный эффект на продукцию

активных форм кислорода. Выраженность супрессивного действия обоих соединений на поглотительную активность фагоцитирующих клеток и ацидификацию фагосом по абсолютным параметрам в очаге воспаления существенно ниже, чем на продукцию активных форм кислорода.

В результате работы обоснована высокая информативность современных инструментальных методов оценки функций фагоцитирующих клеток в сравнении с общепринятым подходом исследования изменения только количества клеток в очаге воспаления для доклинического исследования активности новых лекарственных соединений.

Библиографический список

1. Черешнев В.А., Шилов Ю.И., Черешнева М.В., Самоделкин Е.И., Гаврилова Т.В., Гусев Е.Ю., Гуляева И.Л. Экспериментальные модели в патологии. – 2-е изд., перераб. и доп. (ISBN 978-5-7944-2356-3). – Пермь: Изд-во Пермск. гос. ун-та, 2014. – 324 с.
2. Шилов С.Ю., Жукова А.Е., Петухова А.А., Барков С.Ю., Шилов Ю.И. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных клеток и лейкоцитов крови крыс с использованием маркера ацидификации фагосом pHrodo™ // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18). – № 2 (1). – С. 352–354.
3. Шилов С.Ю., Шилов Ю.И., Туляев Я.А., Барков С.Ю. Изменение показателей фагоцитоза с маркером ацидификации фагосом pHrodo™ при зимозановом перитоните у крыс // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22). – № 2. – С. 984–986.
4. Шилов Ю.И., Годовалов А.П., Шилов Д.Ю., Шилов С.Ю., Eliaš D. Влияние опсонин свежей и инактивированной при 56°C сыворотки крови на зимозан-индуцированную продукцию активных форм кислорода лейкоцитами крыс // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22). – № 2. – С. 981–983.
5. Шилов Ю.И., Ланин Д.В. Влияние гидрокортизона на функции фагоцитирующих клеток брюшной полости крыс в условиях блокады β-адренорецепторов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т. 131, № 10. – С. 439–442.
6. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Жукова А.Е., Барков С.Ю., Петухова А.А. Изменение уровня ацидификации фагосом у крыс в зависимости от фазы эстрального цикла // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 2 (1). – С. 183–184.
7. Basil M.C., Levy B.D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation // Nat. Rev. Immunol. – 2016. – Vol. 16(1). – P. 51–67. doi: 10.1038/nri.2015.4.
8. Cash J.L., White G.E., Greaves D.R. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation // Methods Enzymol. – 2009. – Vol. 461. – P. 379–396.
9. Fujieda Y., Manno A., Hayashi Y., Rhodes N., Guo L., Arita M., Bamba T., Fukusaki E. Inflammation and resolution are associated with upregulation of fatty acid beta-oxidation in zymosan-induced peritonitis // PLoS One. – 2013. – Jun. 11;8(6):e66270. doi: 10.1371/journal.pone.0066270.
10. Mizuno M., Ito Y., Hepburn N., Mizuno T., Noda Y., Yuzawa Y., Harris C.L., Morgan B.P., Matsuo S. Zymosan, but not lipopolysaccharide, triggers severe and progressive peritoneal injury accompanied by complement activation in a rat peritonitis model // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183 (2). – P. 1403–1412.
11. Niu S., Bian Z., Tremblay A., Luo Y., Kidder K., Mansour A., Zen K., Liu Y. Broad infiltration of macrophages leads to a proinflammatory state in streptozotocin-induced hyperglycemic mice // J. Immunol. – 2016. – Vol. 197 (8). – P. 3293–3301.
12. Shilov Ju.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response // Immunology Letters. – 2003. – Vol. 86, N 3. – P. 229–233.
13. Shilov Ju.I., Lanin D.V., Shilov S.Ju., Orlova E.G. Influence of beta-adrenergic receptor blockade on immunomodulatory effects of hydrocortisone (Chapter 7) // New Research on Immunology / Ed. by Barbara A. Veskler / Nova Biomedical Books. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2005. (ISBN: 1-59454-289-9). – P. 167–191.

NEUROENDOCRINE AND PHARMACOLOGICAL REGULATION OF FUNCTIONS OF PHAGOCYtic CELLS UNDER EXPERIMENTAL ZYMOsAN-INDUCED PERITONITIS

Ju.I. Shilov^{1,2,3}, S.Ju. Shilov^{1,2}, S.Ju. Barkov², Ya.A. Tulyaev¹, V.P. Kotegov³,
T.A. Baeva¹, N.A. Shilova²

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

²*Perm State Medical University named after academician E.A. Wagner*

³*Perm State National Research University*

For citation:

Shilov Ju.I., Shilov S.Ju., Barkov S.Ju., Tulyaev Ya.A., Kotegov V.P. Baeva T.A., Shilova N.A. Neuroendocrine and pharmacological regulation of functions of phagocytic cells under experimental zymosan-induced peritonitis // Perm Federal Research Center Journal. – 2021. – № 2. – P. 15–26. <https://doi.org/10.7242/2658-705X/2021.2.2>

The effect of acute stress under conditions of pharmacological blockade of peripheral beta-adrenergic receptors by nadolol on the quantity of phagocytic cells, their uptake activity and acidification phagosomes, production of reactive oxygen species in zymosan peritonitis, immunomodulatory effect on the same parameters of dehydroepiandrosterone, the influence of castration on the sex dimorphism of inflammatory response of phagocytic cells, sex differences in stress changes in the inflammatory response and the effect of sex steroid hormones on them, immunomodulatory effect of a nonsteroidal anti-inflammatory drug based on (Z)-3-(2-oxo-2-(4-tolyl)-ethylidene) piperazine-2-one in comparison with diclofenac sodium on the function of phagocytic cells under the development of zymosan peritonitis were investigated in an experiments on non-inbred white rats of both sexes.

The studies carried out open a number of new directions for elucidating the mechanisms of neuroendocrine regulation of the functions of phagocytic cells during inflammation, developing methodological approaches for the experimental preclinical assessment of new drugs using modern instrumental methods.

Keywords: zymosan-induced peritonitis, inflammation, phagocytic cells, immune system, stress, adrenergic compounds, sex steroid hormones, dehydroepiandrosterone, sexual dimorphism of the immune system, new nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Сведения об авторах

Шилов Юрий Иванович, кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН («ИЭГМ УрО РАН»), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; доцент кафедры иммунологии, Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера (ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера), 614990, г. Пермь, улица Петропавловская, 26; доцент кафедры микробиологии и иммунологии, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: jshilov@mail.ru

Шилов Станислав Юрьевич, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН»; доцент кафедры нормальной физиологии, ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера; e-mail: stshilov@mail.ru

Барков Сергей Юрьевич, старший лаборант кафедры иммунологии, ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера; e-mail: s.barkov1989@mail.ru

Туляев Ярослав Александрович, аспирант лаборатории экологической иммунологии, «ИЭГМ УрО РАН»; e-mail: rgavii@bk.ru

Котегов Виктор Петрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и фармации, ПГНИУ; e-mail: viktor.cotegov@yandex.ru

Баева Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, «ИЭГМ УрО РАН»; e-mail: baeva@iegmu.ru

Шилова Наталья Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры иммунологии, ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера; e-mail: natalshilova@mail.ru

Материал поступил в редакцию 31.03.2021 г.