

НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГОРМОНАЛЬНОГО И ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА

Э.Х. Рахматулина, С.Н. Теплова, Д.А. Альтман
**Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь
для ветеранов войн, г. Челябинск**

Определены уровни кортизола, конечных стабильных метаболитов оксида азота, активности комплемента и его компонентов C1-C5, количества растворимого Fas рецептора и IL-12 в слюне до и после воздействия экстремального холодового и психо-эмоционального стресса. Показана принципиальная возможность использования неинвазивных методов для оценки гормонального и иммунного гомеостаза, определения общих и специфических особенностей стресс-индуцированных изменений гомеостаза под влиянием стрессов разной природы.

Ключевые слова: гормональный и иммунный гомеостаз, психо-эмоциональный стресс.

Неинвазивные технологии исследования являются более предпочтительными для повседневного использования, чем инвазивные, при условии высокой чувствительности и специфичности применяемых методов. К такого рода методам относятся современные лабораторные иммунологические технологии исследования биологических жидкостей на содержание гормонов и регуляторных пептидов и для оценки состояния гуморальных систем, обеспечивающих противомикробную защиту организма. Между тем при оценке гормональной регуляции и состояния иммунитета, в том числе стресс-индуцированного характера, общепринято использование иммунологических методов с определением показателей в крови. Нами сделана попытка оценить возможность применения неинвазивных методов определения некоторых гормональных и иммунных показателей для выявления стресс-индуцированных нарушений гомеостаза путем изучения этих показателей в слюне.

Цель исследования: определение иммунных показателей слюны для верификации стресс-индуцированных изменений при воздействии на организм человека экстремального холодового, а также психо-эмоционального стресса.

Материалы и методы. В настоящее исследование было включено 63 человека: 23 мужчины в возрасте 25–35 лет и 40 студентов в возрасте 19–21 года. В качестве стрессовых нагрузок использовались модели общего охлаждения организма и психо-эмоциональный стресс. Кратковременное экстремальное охлаждение поверхности тела (ниже уров-

ня шеи) проводилось однократно направленными потоками сухой воздушно-азотной смеси с температурой от –130 до –140 °С на установке КАЭКТ-01-«КРИОН». Длительность процедуры составляла 60 с. В качестве психо-эмоционального стресса использовали общепринятый в нейроиммунологии экзаменационный стресс [4], у студентов медицинской академии.

Для оценки развития стресс-индуцированных изменений организма с помощью неинвазивных технологий определяли уровень кортизола, общую активность системы комплемента и ее отдельных компонентов, характер изменения нитроксидергической регуляции на основе определения показателей слюны. Исследование проводилось до и сразу после стрессового воздействия.

Слюну забирали после осмотра стоматолога у лиц без признаков зубной и иной патологии в ротовой полости, натошак, в утренние часы после полоскания рта водой. Забор материала проводили через 10 мин без стимуляции слюноотделения.

В биологической жидкости определяли: активность комплемента по 50 % гемолизу (Резникова Л.С., 1967; Кэбот Е. и Мейер М., 1968); активность компонентов комплемента C1-C5 методом молекулярного титрования (Красильников А.П., 1984; Shinobu A., Tanaka S. et al., 1986) с учетом результатов реакции на планшетном фотометре «Multiscan plus». Уровни кортизола, sFas рецептора, IL-12 определяли с помощью иммуноферментного анализа. При измерении количества кортизола использовали тест-систему для определения гормона в слюне

CORTISOL ELISA Kit, 96 (DBC); для измерения уровня растворимого Fas-рецептора в слюне применяли тест-систему sAPO -1/FAS, 96 (Bender Medsystems), а для определения IL-12 – тест-систему Interlukine-12 (p 40 + p 70), 96 (Bender Medsystems). Определение уровня оксида азота в слюне проводили модифицированным методом Griess (Коробейникова Э.Н., 2002).

Статистическая обработка проведена с применением программного комплекса Statistica for Windows версия 6.0 фирмы StatSoft Inc. (США). В таблицах представлены данные в виде универсальной средней – медианы (Me) и межквартильного интервала (Q25-Q75), достоверность различий до и после воздействия стрессовых факторов верифицирована непараметрическими методами по критерию Колмогорова – Смирнова. Минимальный уровень достоверности различий между группами $p < 0,05$ [2], при значениях $p < 0,1$ различия оценивались как статистически вероятные [3].

Результаты исследования и обсуждение

Группа лиц, которые подвергались воздействию охлаждающей воздушной смеси, составила 23 человека, средний возраст обследуемых 39,5 лет. Результаты определения показателей слюны с помощью иммунологических методов до и после воздействия охлаждения азот – воздушной смесью приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, при кратковременном общем охлаждающем воздействии на организм азот-воздушной смеси в слюне происходит достоверное повышение уровня кортизола, рост количества которого в биологических жидкостях является характерным маркером изменений функции надпочечников стресс-индуцированного характера [1, 5].

Из таблицы следует, что общая активность системы комплемента достоверно не меняется под влиянием экстремального холодового стресса в отличие от активности отдельных компонентов системы, которая существенно и с высокой степенью достоверности снижается после кратковременного воздействия стресса. После холодового воздействия у обследуемых лиц произошло снижение в слюне активности всех изучаемых компонентов классиче-

ского пути активации, функционирующих по принципу ограниченного протеолиза (C1, C2, C3, C4, C5), что может быть связано с ферментативной деградацией отдельных белков и других химических соединений в результате формирования катаболического профиля обмена веществ, характерного для постстрессовых реакций организма.

Согласуется с этими данными также снижение на уровне статистически вероятной тенденции в слюне количества растворимого sFas рецептора, участвующего в регуляции процессов апоптоза клеток ($p = 0,056$). Падение уровня растворимого рецептора может быть связано с зависящим от действия низких температур уменьшения продукции мембранных и растворимых рецепторов клетками, либо с расщеплением растворимых белков, находящихся в сыворотке крови, в ходе усиления процессов протеолиза. Наибольший интерес представляет выявление на уровне статистически вероятной тенденции роста в слюне уровня IL-12, продуцентом которого являются антиген-представляющие клетки, что свидетельствует об усилении активности этих клеток при холодовом стрессе и что может иметь принципиальное значение для усиления клеточного иммунного ответа стресс-индуцированного характера.

Воздействие стресса на организм приводит к изменению уровня внутриклеточных мессенджеров, к которым относится NO. Оксид азота является газообразным продуктом и поэтому уровень его меняется не только внутри клеток-продуцентов, но в общем объеме биологических жидкостей, омывающих клетки. Основным продуцентом индуцибельного NO являются макрофаги [4, 5]. Для оценки уровня оксида азота до и после экстремального воздействия холода в слюне определяли терминальные стабильные метаболиты оксида азота: нитриты, нитраты и суммарные метаболиты. Результаты представлены в табл. 2.

Данные табл. 2 свидетельствуют о многократном повышении конечных стабильных метаболитов оксида азота в слюне при воздействии такого экстремального холодового фактора как действие охлаждающей азот-воздушной смеси, с которым че-

Таблица 1

Влияние общего холодового воздействия на показатели слюны

Показатель	До криосауны		После криосауны		P
	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	
Уровень кортизола, нг/мл	4,9	4–5,6	8	7–9	0,001
Общая активность комплемента (СН 50)	52,3	50–54,2	51,6	50,4–53,9	0,5
C1 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,237	0,216–0,261	0,089	0,087–0,098	0,001
C2 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,229	0,187–0,242	0,098	0,087–0,108	0,001
C3 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,221	0,195–0,261	0,114	0,1–0,12	0,001
C4 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,261	0,214–0,281	0,128	0,116–0,137	0,001
C5 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,266	0,204–0,280	0,139	0,129–0,146	0,001
sFas	466,3	395,0–541,2	306,9	263,1–309,4	0,056
IL-12	5,47	4,15–5,99	7,10	6,76–7,75	0,057

людей никогда ранее не встречался в ходе эволюции. Отмечен рост в слюне всех изучаемых метаболитов NO с высокой степенью достоверности, что позволяет утверждать увеличение продукции макрофагами и другими клетками-продуцентами оксида азота, изменение характера нитроксидергической регуляции после воздействия изучаемого холодового стресса.

Результаты определения иммунологических показателей слюны у 40 студентов-медиков (средний возраст – 20,5 лет), подвергающихся действию психо-эмоционального экзаменационного стресса, приведены в табл. 3.

Определение уровня кортизола в слюне до и после экзамена, проведенное с помощью иммуноферментного анализа, показало достоверный трехкратный рост гормона в биологической жидкости, что объективно отражает стресс-индуцированные изменения функции надпочечников при действии психо-эмоционального стресса.

Изменения иммунологических показателей мукозального иммунитета в условиях воздействия психо-эмоционального экзаменационного стресса

характеризовались ростом общей гемолитической активности комплемента при снижении активности отдельных компонентов классического пути активации системы (C1-C5), выявленным ростом уровня sFas и существенным снижением количества IL-12 в слюне при высокой степени достоверности полученных результатов ($p = 0,001 - 0,005$). Изменения уровня метаболитов NO в слюне под влиянием психо-эмоционального стресса представлено в табл. 4. Из табл. 4 следует, что после перенесенного психо-эмоционального стресса у обследуемых лиц выявляется с высокой степенью достоверности рост содержания терминальных стабильных метаболитов оксида азота в слюне (NO_x, NO_2, NO_3).

В результате проведенных исследований установлено, что общим для постстрессовых изменений при воздействии холодового и психо-эмоционального стресса является изменения гормональной и нитроксидергической регуляции организма, о чем свидетельствует достоверный и многократный рост уровня кортизола, а также содержания конечных стабильных метаболитов оксида азота в слюне. При действии двух разных по своей природе стрессоров

Таблица 2

Уровень конечных стабильных метаболитов оксида азота в слюне при холодовом воздействии на организм

Показатель	Исходные показатели			После стрессового воздействия		P
	n	Me	Q25-Q75	Me	Q25-Q75	
NO _x мг/л	23	3,82	2,96–4,11	39,2	35,40–85,2	0,005
NO ₂ мг/л	23	1,01	0,94–1,4	13,1	2,78–21,0	0,005
NO ₃ мг/л	23	2,42	1,72–3,66	31,8	28,00–34,5	0,005

Таблица 3

Влияние психо-эмоционального стресса на иммунологические показатели слюны

Показатель	До экзамена		После экзамена		P
	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	
Уровень кортизола, нг/мл	3,2	4–5,6	10,5	9,25–12,25	0,001
Общая активность комплемента (CH 50)	45,6	38,2–48,3	55,4	54,1–57,6	0,003
C1 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,134	0,104–0,202	0,119	0,084–0,138	0,006
C2 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,132	0,091–0,169	0,089	0,074–0,117	0,005
C3 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,116	0,084–0,147	0,081	0,048–0,108	0,007
C4 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,164	0,126–0,199	0,123	0,086–0,153	0,002
C5 × 10 ⁸ эфф. мол/мл	0,174	0,119–0,208	0,174	0,154–0,191	0,059
sFas	183,7	182,5–23,6	290,5	241,4–444,7	0,005
IL-12	24,82	7,7–28,89	18,4	17,6–18,8	0,003

Таблица 4

Уровень конечных стабильных метаболитов оксида азота в слюне при психо-эмоциональном стрессе

Показатель	До экзамена			После экзамена			P
	n	Me	Q25-Q75	n	Me	Q25-Q75	
NO _x мг/л	40	2,82	2,40–3,10	20	35,2	24,2–65,4	0,005
NO ₂ мг/л	40	1,00	1,01–1,3	20	10,1	3,8–24,0	0,005
NO ₃ мг/л	40	1,82	1,55–2,62	20	25,1	21–27,5	0,005

были установлены также однонаправленные изменения со стороны системы комплемента, в виде снижения активности C1-C5 компонентов в слюне, что, вероятно, отражает формирование стресс-индуцированного катаболического профиля обмена веществ организма.

Вместе с тем выявлены и особенности действия каждого из стрессоров. Так, общая активность системы комплемента после холодового воздействия не меняется, а после психо-эмоционального стресса с высокой степенью достоверности увеличивается ($p = 0,003$). После холодового воздействия содержание sFas рецептора в слюне падает на уровне статистически вероятной тенденции, а после психо-эмоционального стресса существенно растёт. Можно полагать, что при действии психо-эмоционального стресса в нормальных температурных условиях продукция рецептора клетками не меняется, а протеолитическое отщепление мембранных Fas рецепторов происходит весьма активно в связи с усилением процессов катаболизма стресс-индуцированного характера. Разнонаправленные изменения установлены при действии разных стрессов со стороны уровня IL-12 в биологических жидкостях: при холодовом стрессе установлена тенденция роста интерлейкина, а при действии психо-эмоционального стресса – его достоверное снижение. Рост IL-12 при холодовом стрессе можно оценить как адекватную компенсаторную реакцию иммунной системы, способствующую формированию Tх1-зависимого иммунного ответа, обеспечивающего противомикробную устойчивость слизистых оболочек и организма в целом при действии холода. Напротив, падение уровня этого интерлейкина в период действия экзаменационного стресса может отражать снижение противомикробной защиты организма и определять частое развитие у студентов в период экзаменационной сессии снижение противомикробной защиты слизистых оболочек с развитием обострения хронического тонзиллита и других инфекционно-воспалительных заболеваний ЛОР-органов, описанных рядом авторов у студентов в период экзаменационной сессии [4, 6].

Таким образом, неинвазивные методы оценки иммунологических показателей слюны являются высокочувствительными и позволяют выявить общие и специфические особенности стресс-индуци-

рованных изменений состояния гормональной регуляции и мукозального звена иммунной системы.

Выводы

1. Установлена возможность выявления стресс-индуцированных изменений гормонального и иммунного гомеостаза с помощью неинвазивных иммунологических методов оценки показателей слюны.

2. Общим для холодового и психоэмоционального стресса является изменения характера гормональной и нитроксидергической регуляции в виде роста уровня кортизола и конечных стабильных метаболитов в слюне, а также однонаправленные изменения (снижение) активности C1-C5 компонентов комплемента.

3. Выявлены особенности действия экстремального холодового и психо-эмоционального стресса на формирование условий для Tх1 поляризации иммунного ответа на мукозо-саливарном уровне в виде статистически вероятной тенденции роста количества IL-12 в слюне при холодовом стрессе и достоверного снижения этого цитокина в слюне под влиянием психоэмоционального стресса.

Литература

1. Медведев, В.И. Устойчивость физиологических и психологических функций человека при действии экстремальных факторов / В.И. Медведев. – Л.: Наука, 1982. – 102 с.
2. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
3. Трахтенберг, И.М. Проблема нормы в токсикологии / И.М. Трахтенберг, Р.Е. Сова, В.О. Шефтель. – М.: Медицина, 1991.
4. McEwen, B. Stress: hormonal and neural aspects // *Encyclopedia of the human brain* / B. McEwen, S. Lupien. – Ed.-in-chief V.S. Ramachandran. Academic Press. – 2002. – V. 4. – P. 463–474.
5. Newport, D.J. Stress // *Encyclopedia of the human brain* / D.J. Newport, C.B. Nemeroff. – Ed.-in-chief V.S. Ramachandran. Academic Press. – 2002. – V. 4. – P. 449.
6. Stampfer, H.G. Stress-induced modulation of antiviral immunity / H.G. Stampfer // *Brain Behav Immunity*. – 1990. – V. 12. – P. 1–6.

Поступила в редакцию 7 июня 2008 г.