

Новый подход к мануальной терапии иммунной системы: экспериментальное исследование

Daniel Grosjean, Afonso Shiguemi Inoue Salgado^b, Rodolfo Borges Parreirab, Lisandro AntЦnio Cecib, Emerson Carraroc, Andressa Panegalli Hosnid, Andressa Leticia Mirid, Jossinelma Camargo Gomesd, Ivo Ilvan Kerppers*^e

A Private Clinic - 30 r Foch, 57240 NILVANGE,
France.

B School of Postural and Manual Therapy, Salgado
Institute of Integral Health, Londrina-PR, Brazil. 86055-
240;

C Laboratory of Virology and Molecular Biology,
Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava,
Paran3, Brazil.

D Physiotherapy students, Universidade Estadual do
Centro Oeste, Guarapuava, Parana, Brazil.

E Laboratory of Neuroanatomy and Neurophysiology,
Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava,
Paran3, Brazil.

Submission: 25 October 2017
Accepted: 2 November 2017
Published: 30 November 2017

1. ВВЕДЕНИЕ

Все функции живого организма зависят от адекватного равновесия со средой. Этот баланс поддерживается адаптивной реакцией, состоящей из серии физических и эмоциональных реакций, которые ограничивают пагубное воздействие стрессов в попытке поддерживать гомеостаз в организме. Гомеостазу постоянно угрожают внутренние и внешние факторы¹. Чтобы поддерживать это равновесие, адаптивная реакция необходима. По словам Селье², это зависит от качества (физического или эмоционального), интенсивности и продолжительность стимула, при котором любое нарушение, изменяющее гомеостаз, считается стрессом. Эта реакция на стресс необходима для выживания. Когда интенсивность любого стресса выходит за пределы умения организма отреагировать, возникает «стрессовый синдром»¹.

Следовательно, стресс можно определить как любую ситуацию, способную нарушить наши физиологические или психологические функции, психологический гомеостаз и может привести к последствиям, которые влияют на поведенческие, эндокринные и иммунологические свойства в зависимости от интенсивности и продолжительности действия стресса³. В настоящее время, мы сталкиваемся с широким спектром неблагоприятных ситуаций, которые оказывают значительное влияние на многие аспекты нашей повседневной жизни, в зависимости от того, как организм реагирует на стрессовый фактор. Гомеостаз в

иммунной системе полностью зависит от адекватного взаимодействия регуляторов клетки ⁴. Основные медиаторы, участвующие в адаптивных ответах на стресс являются глюкокортикоиды и катехоламины, а равновесие между цитокины Th1 (провоспалительные) и Th2 (противовоспалительные) также имеют большое значение ⁵.

Равновесие Th1 / Th2 имеет фундаментальное значение для защиты организма от внешних факторов. Например, клетки Th1 становятся активными в ответ на внутриклеточные бактериальные и вирусные атаки, а также играют роль в активации макрофагов и появлении антигенов за счет высвобождения интерферона- γ (IFN- γ), интерлейкина-2 (IL-2) и фактора некроза опухоли. α (TNF- α). И наоборот, иммунные цитокины, характерные для Th2, такие как IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, способствуют гуморальной защите, стимулируя эозинофилы и В клетки против внеклеточных патогенов ⁶.

Несколько предыдущих исследований показали, что у взрослых, подвергшихся острому стрессу, наблюдается повышенная производство цитокинов Th14, а также более высокая активность Th2 с большим производством провоспалительных агентов, таких как TNF- α , которые проявляются при дисбалансе Th1 / Th2. В соответствии с Сян ⁴ этот дисбаланс может сохраняться до недели после окончания стрессового события. Эти механизмы частично ответственны за нарушения в иммунной системе, при этом повышение воспалительной активности приводит к значительному риску развития заболевания или расстройств, если оно не регулируется должным образом.

Существует ряд вариантов лечения, включая использование лекарств для восстановления Th1 / Th2. равновесия ^{7,8}. Однако консервативные и немедикаментозные протоколы лечения представляют собой хорошую альтернативу для пациентов, поскольку у них мало или совсем нет побочных эффектов. Руководство по проведению терапии является одним из этих вариантов и включает в себя широкий спектр техник, в которых терапевт использует руки для контакта с кожей пациента, чтобы оценить, идентифицировать и лечить разнообразие клинических состояний и восстановление нормального функционирования организма ⁹. В ряде исследований содержится информация о влиянии мануальной терапии на иммунную систему, особенно в отношении цитокинов Th1 и Th2 ^{10,11}.

Микрокинезитерапия включает мануальную терапию, которая воздействует непосредственно на поверхность тела, чтобы выявлять и лечить клинические состояния с глобальными результатами ^{12,13}. Методика включает выявление основной причины заболевания и/или симптомов и предоставление возможности организму «исцелить самому». Таким образом, организм распознает агрессора (антиген) и начинает устранение посредством клеточного и тканевого перепрограммирования ¹⁴. Микрокинезитерапия – это метод, который предполагает целостный подход, и поскольку стресс влияет на организм в целом, включая несколько различных систем, мы предполагаем, что микрокинезитерапия будет действовать на защитные системы. В этом случае, иммунная система, будет способствовать восстановлению баланса таких компонентов, как цитокины Th1 и Th2. Эти цитокины реагируют на острое или хроническое стрессовое событие нарушением регуляции иммунной системы. Таким образом, цель настоящего исследования состоит в том, чтобы проанализировать влияние микрокинезиерапии на острый стресс, индуцированный у крыс, путем анализа цитокинов Th1 и Th2.

2. МЕТОДЫ

2.1. Образцы

Всего в настоящем исследовании было использовано 45 крыс линии Вистар (весом около 200

граммов). До индукции острого стресса крысы имели свободный доступ к пище и воде и содержались в 12-часовом цикле свет/темнота. Их случайным образом разделили на три группы:

контрольная группа (CG), в которой участвовали стрессы без лечения (n = 15);
плацебо группа (PG), который включал стресс и ласки животных в ответ (n = 15);
группа лечения (TG), в котором животных лечили с помощью микрокинезитерапии (n = 15).

Эти группы были подразделены на CG3, CG7 и CG21; PG3, PG7 и PG21; TG3, TG7 и TG21; где 3, 7 и 21 означают анализ, сделанный после лечения. Настоящее исследование получило одобрение Комитета по этике использования животных, номер протокола 034/2014.

2.2. Вызвание острого стресса

Модель депривации сна использовалась для индукции острого стресса ¹⁵. Животных держали в клетке индивидуально и альтернативно при следующих условиях: 16 часов без воды; две ночи непрерывного освещения; два периода (7 и 17 ч) наклона 45° клетки; один период 17 часов в грязной клетке (100 мл воды на подстилке из опилок); один период (8 ч) без еды; и период 17 часов в паре с другим животным в клетке (животные всегда были в паре с одним и тем же партнером).

2.3. Процедура мануальной терапии

2.3.1. Обработанная группа

Применение микрокинезитерапии началось с пальпаторной оценки. Лечение проводил одновременно один из исследователей (DG), кто имел предыдущий опыт использования этой техники. Оценка включала пальпаторное обследование, в котором проводилось на коже животных в попытке найти уменьшение кожного подвижность тканей. Такой прием может быть продемонстрирован висцеросоматическим рефлексом, где это рефлекс инициируется афферентным импульсом от висцерального расстройства к соматическим тканям, что приводит к сенсорные и моторные изменения в скелетных мышцах и коже ¹⁶. Это было показано в исследовании, в котором авторы ¹⁷ обнаружили согласованные данные о висцеросоматическом рефлекс, при котором остеопаты во время пальпации обнаружили изменения в соматических тканях, такие как уменьшение подвижность кожных покровов.

Исследователь использовал обе руки или средний и указательный пальцы, в зависимости от размера исследуемой области тела. Места с пониженной подвижностью кожи, обнаруженные в животные показаны на рисунке 1. После того, как эти ограничения были обнаружены, цель терапия заключалась в уменьшении напряжения или ограничения подвижности кожной ткани. Это было проводится путем соединения обеих рук на найденных гипомобильных точках и поддержании в этом положении до снятия напряжения.

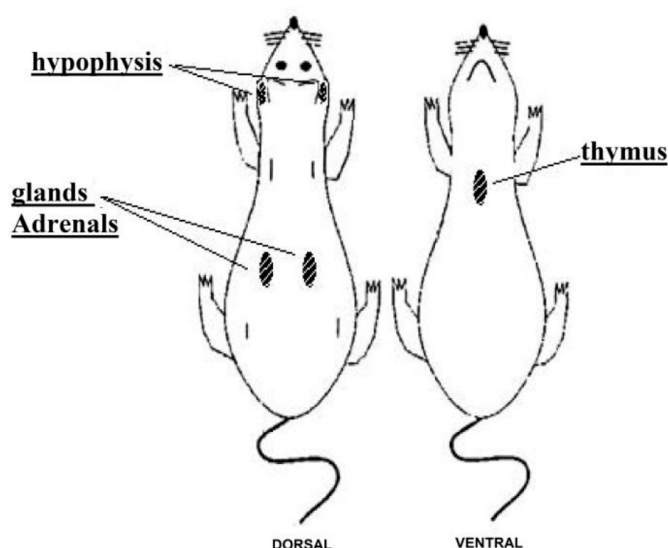


Рисунок 1. Локализация снижения подвижности кожи у животных.

2.3.2. Плацебо и контрольная группа

Каждое животное из группы плацебо было извлечено из клетки и помещено на место исследователя. рука (АН), а другой рукой держала шею и нежно гладил по спине в течение 10 минут. Этот исследователь (АН) не знал о технике микрокинезитерапии, чтобы исключить любые возможные эффекты этой техники. Таким образом мы пытались показать два различных эффекта. Контрольную группу не тревожили на протяжении всего протокола, за исключением регулярной чистки клетки, которая проводилась для всех животных одним и тем же исследователем.

2.4. Цитометрия

Всего у каждой крысы было собрано 1 мл крови для анализа проточной цитометрией (BD Accuri C6 - Бектон Дикинсон, США). Это содержимое помещали в микропробирки объемом 1,5 мл. и выдерживали на водяной бане в течение 15 минут, а затем центрифугировали при 1500 об / мин в течение 5 минут при 18 градусах Цельсия. После центрифугирования супернатант (сыворотка) отделяли для дальнейшего использования. Набор цитокинов th1 / th2 мыши BD™ cytometric bead array (CBA) был использован для обнаружения IL-2, IL-4, IL-6, TNF α и IFN в соответствии с инструкциями производителя. Изначально мы добавили 50 мкл образца сыворотки от каждой крысы к 50 мкл смеси, содержащей равной пропорции конкретных гранул для каждого цитокина, с 50 мкл реагента обнаружения и 50 мкл стандартный разбавитель. После инкубации в течение двух часов в темноте добавляли 1 мл воды и центрифугировали при 2000 об / мин в течение 5 минут при 4 градусах Цельсия. Впоследствии супернатант был удален и ресуспендирован в 300 мкл воды.

Теоретический предел обнаружения для каждого цитокина с использованием набора цитометрических шариков BD™ (CBA) набор цитокинов th1 / th2 мыши определяли как концентрацию, соответствующую двум стандартным отклонениям выше средней флуоресценции 30 повторов отрицательного контроля (0 пг / мл). Применялись следующие пределы: IL-2 = 0,1 пг / мл; IL-4 = 0,03 пг / мл и TNF = 0,9 пг / мл. Считывание цитометрии проводилось вручную с получением 10000 события из каждой выборки.

2.5. Анализ данных цитометрии

Программное обеспечение FCap 3.0 Array использовалось для анализа образцов после выполнения потока цитометрии. Результаты отображались в виде графиков, включая среднее и стандартное отклонения ценности.

2.6. Эвтаназия

Все крысы были умерщвлены через 1 день после процедур. Животных анестезировали 80 мг / кг кетамина и 15 мг / кг ксилазина и умерщвлены внутрибрюшинной инъекцией смертельной дозы тиопентала. Процедура проводилась в экспериментальной комнате без присутствия других животных.

2.7. Статистический анализ

Использовался критерий нормальности Шапиро-Уилка, и образец анализировался с помощью теста Крускала-Уилка. Тест Уоллиса с последующим тестом Данна.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

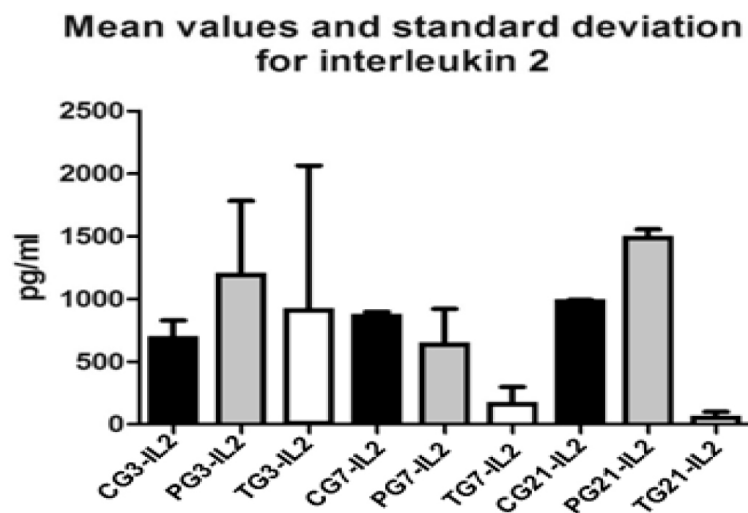


рисунок 2.

На рисунке 2 показаны значения среднего и стандартного отклонения для интерлейкина 2 в контроле группы плацебо и группы лечения (микрокинезитерапии). Отметим, что эти значения составили $648,8 \pm 144,2$ пг / мл в CG3, $863,9 \pm 33,19$ пг / мл в CG7 и $978,8 \pm 12,01$ пг / мл в CG21. Это было повышение интерлейкина 2 (пг / мл) в ХГ. Средние значения составили $1191,0 \pm 591,8$ пг / мл в PG3, $635,6 \pm 284,3$ пг / мл в PG7 и $1484,0 \pm 71,92$ пг / мл в PG21, с заметной дисперсией между значениями интерлейкина в PG3 и PG21. Средние значения составили $907,8 \pm 1156$ пг / мл для TG3, $156,4 \pm 140,3$ пг / мл для TG7 и $50,35 \pm 49,07$ пг / мл для TG21. Статистически нет значимые значения были обнаружены в тесте Краскала Уоллиса ($P = 0,1483$).

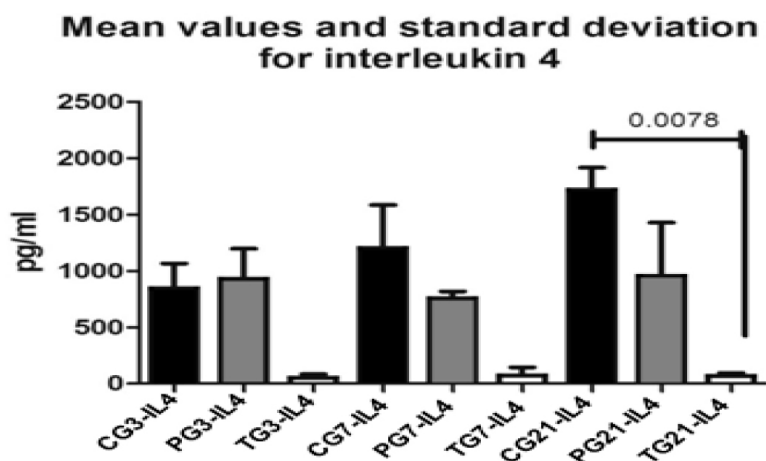


рисунок 3.

На рисунке 3 показаны значения среднего и стандартного отклонения для IL-4: CG3 = $845,5 \pm 219,4$; CG7 = $1204,0 \pm 381,0$; и CG21 = $1718,0 \pm 197,8$. Обратите внимание, что наличие этого интерлейкина увеличился в КГ за период исследования. Значения среднего и стандартного отклонения в PG3 были $929,2 \pm 266,7$, в то время как в PG7 были $755,4 \pm 70,9$, а в PG21 были $953,9 \pm 474,9$. В PG было четкое поддержание пг / мл интерлейкина 4. В TG3, средние значения составили $49,15 \pm 36,23$, в то время как в TG7 они были $74,79 \pm 70,09$, а в TG21 они составили $67,37 \pm 27,92$. Обратите внимание, что уровни интерлейкинов немного увеличились в TG7 и остались низкий в два других периода. Статистически значимая разница была зафиксирована в статистический анализ ($p = 0,0008$). Пост-тест Данна подтвердил существенные различия между группы, самая большая из которых произошла между CG21 и TG21 ($P = 0,0078$).

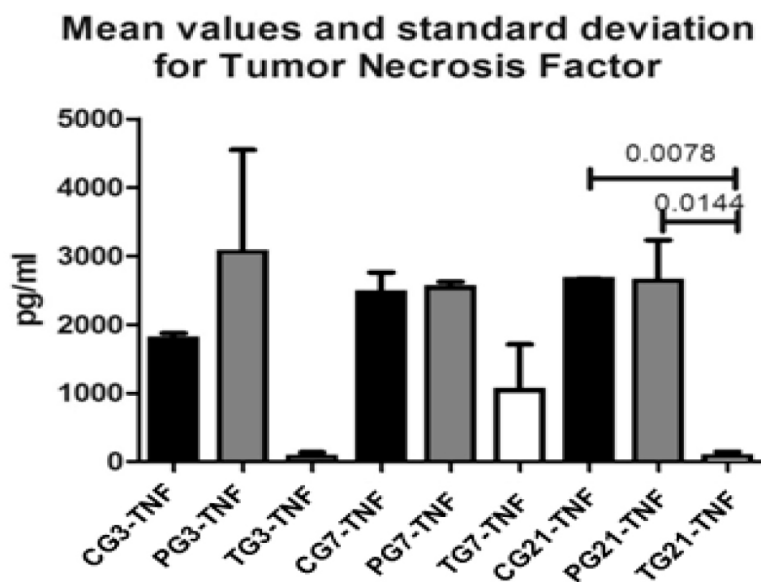


рисунок 4.

Уровни пг / мл для TNF- α составляли $1788,0 \pm 85,50$ пг / мл в CG3, $2464,0 \pm 295,3$ пг / мл в CG7. и $2657,0 \pm 7,6$ пг / мл в CG21. Было обнаружено, что уровни TNF- α увеличиваются в CG и рост был непрерывным. Среднее значение и стандартное отклонение составили $3052,0 \pm 1496,0$ пг / мл. в PG3, $2536,0 \pm 88,71$ пг / мл в PG7 и $2636,0 \pm 593,8$ пг / мл в PG21. В этом случае для PG уровни TNF- α показали небольшое снижение концентрации. Среднее и стандартное значения отклонения составили $62,28 \pm 72,87$ пг / мл в TG3, $1039,0 \pm 670,7$ пг /

мл в TG7 и $74,85 \pm 68,41$ пг / мл в TG21. Примечательно, что концентрация TNF- α была выше в TG7, чем в TG3 и TG21. TG3 и TG21 показали аналогичные уровни. В статистическом анализе значения представили значимые данные с р-значением $p = 0,0033$. Статистически значимая разница был зарегистрирован в тесте Данна в $CG21 \neq TG21$ и $PG21 \neq TG21$, со значениями $p 0,0078$ и $0,0144$ соответственно (рис. 4).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Chennoui¹⁸ проанализировали присутствие TNF- α во время депривации сна и сообщили, что этот цитокин играет роль в этой ситуации. Те же авторы подтвердили, что концентрации TNF- α и IL-6 были значительно выше среди лиц, ведущих малоподвижных крыс, чем среди сидячих контрольных крыс. Кроме того, концентрация IL-6 была статистически ниже у крыс, лишенных сна, которые выполняли упражнения, чем у крыс, ведущих малоподвижный образ жизни крыс. В настоящем исследовании значения TNF были высокими в группах CG и PG (3, 7 и 21 дней) по сравнению с группами TG. Это говорит о том, что методика лечения животных был эффективна с точки зрения контроля высвобождения TNF клетками. Настоящее исследование подтвердило, что TNF- α (провоспалительный цитокин) может активировать иммуноопосредованное воспаление головного мозга, тем самым увеличивая лабораторные доказательства того, что TNF- α активирует молекулярные, например, воспалительные механизмы, вызывающие нейротоксичность.

Техника микрокинезитерапии способствовала немедленной и отсроченной активности (на два месяца). Подтвердить влияние провоспалительных и противовоспалительных средств можно, сравнив TNF- α и IL-2 с IL-4, которые увеличивались в 21-дневный период в группе лечения. Тонкая тактильная стимуляция способна поддерживать гомеостаз метаболизма кожи, тем самым демонстрируя взаимодействие между нейроэндокринной системой и кожной стимуляцией^{19,20}. Этот тонкий контакт (предлагаемый в микрокинезитерапии) изменяет ось НРА через изменения в иммунной системе, учитывая, что кожа и ее придатки могут генерировать те же медиаторы, которые используются во время реакции на системный стресс²¹. Через ось НРА кожи, активное напряжение клеток приводит к избирательному подавлению TH1 ответ, изменяющий гуморальный иммунитет²². Ряд авторов продемонстрировали, что кожа и ее придатки богато иннервируются, а их эфферентные сигналы хорошо представлены сенсорной корой^{20,23}, что может объяснить улучшение регуляции цитокинов в настоящее исследование. Протоколы лечения, включающие легкую тактильную стимуляцию, предоставили благоприятные результаты среди людей и животных в отношении стресса²⁴, автономной нервной системой²⁵ и нейроиммунорегулирующие системы²⁶.

Meltzer²⁷ и MacNeil²⁸ сообщили, что высокий тон в социальных связях является ответом на воспалительные изменения в системе. Высокие циркулирующие концентрации TNF- α , IL-1 и IL-6 действует на гипоталамус, стимулируя пути центральной нервной системы, которые заставляют симпатическую систему расходовать энергию в соответствующих тканях-мишенях, включая вторичные лимфоидные ткани и очаги воспаления. В настоящем исследовании тонкий контакт, участвующий в микрокинезитерапии, выявил ограничения подвижности тканей на участках соответствующие надпочечникам, гипофизу и вилочковой железе. После вмешательства при легком прикосновении (примерно от 5 до 10 граммов) произошло значительное снижение количество цитокинов ИЛ-4 и ФНО- α . Эти реакции на стресс могут возникать в результате: эффективные функции, которые продвигают эти тонкие прикосновения по сравнению с отличительными тактильные функции. Афферентные волокна типа C (Cf) реагируют минимальным контактом²⁹. Более того, Milne³⁰ ранее продемонстрировали, что спиноталамические нейроны сводят эти ноцицептивные входы к

коже, когда сталкиваются с висцеральным стимулом. Согласно Craig³¹, можно рассматривать как большое расширение афферентной системы, которая участвует в мониторинге тканей (кожи, мышц и внутренних органов). Эта система объединяет несколько внутренних сигналов (тела) и кожной ткани, которая жизненно важна для поддержания гомеостатического баланса.

Кроме того, психологический стресс может нанести ущерб нескольким аспектам иммунной системы. Reiche³² сообщил, что связь между ЦНС, эндокринной системой и иммунной системой включает в себя химические мессенджеры, растворимые медиаторы, которые секретируются нервными клетками, клетки эндокринных органов или иммунные клетки, и психологические стрессы могут нарушить эту связь. Palumbo¹⁵ обнаружили, что концентрация IL-8 была значительно ниже среди пациентов с посттравматическим неврозом. Они подтвердили более высокие концентрации IL-2 и IL-6. В настоящем исследовании было обнаружено, что уровень IL-2 оставался высоким в CG3, PG3 и TG3 по сравнению с уровнем, обнаруженным в CG7, PG7 и, в первую очередь, в TG7. Примечательно, что уровень IL-2 был низким в TG21. На основании этих результатов можно предположить, что микрокинезитерапия повлияла на высвобождение IL-2 в период исследования. Это торможение снизилось за 21-дневный период.

В этом исследовании могут возникнуть некоторые ограничения. Отсутствие другого исследователя, чтобы убедиться в достоверности и надежности пальпации на участках с плохой подвижностью кожи. Что касается группы плацебо, тот же исследователь, который выполнил методику в экспериментальной группе, мог иметь выполненную на плацебо, однако, он не будет "слепым" к применяемой технике, и это может помешать результатам. Что касается анализов, то гистохимические данные из надпочечников и гипофиза было бы интересно увидеть эффекты микрокинезитерапии метод на кортизол и ацетилхолин соответственно. Будущие исследования должны решить эти проблемы, чтобы лучше понять механизмы, лежащие в основе микрокинезитерапии, а также исследования на людях, где эффект психологического стресса наиболее близок к реальности.

5. ВЫВОД

На основании анализа сыворотки крыс, подвергнутых микрокинезитерапии, уровни провоспалительных цитокинов оставались ниже уровней других групп. Таким образом, этот метод повлиял на иммунную систему с точки зрения лечения острого стресса.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. Chrousos GP, Gold PW. The Concepts of Stress and Stress System Disorders Overview of. *Jama*. 1992; 267:1244–52.
2. Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1998; 10(2):230–1.
3. McEwen BS, Seeman T. Protective and Damaging Effects of Mediators of Stress: Elaborating and Testing the Concepts of Allostasis and Allostatic Load. *Ann N Y Acad*. 1999; 896(1):30–47.
4. Xiang L, Marshall GD. Immunomodulatory effects of in vitro stress hormones on FoxP3, Th1/Th2 cytokine, and costimulatory molecule mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Neuroimmunomodulation*. 2011; 18(1):1–10.
5. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol*. 2008; 583(2-3):174–85.

6. Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Corsi MP, Quaglino D. The immune system in the elderly: I. Specific humoral immunity. *Immunol Res.* 1999; 20(2):101–8.
7. Martino M, Rocchi G, Escelsior A, Fornaro M. Immunomodulation Mechanism of Antidepressants: Interactions between Serotonin/Norepinephrine Balance and Th1/Th2 Balance. *Curr Neuropharmacol.* 2012; 10(2):97–123.
8. Ahmad SF, Zoheir KMA, Ansari MA, Korashy HM, Bakheet SA, Ashour AE, Attia SM. Stimulation of the histamine 4 receptor with 4-methylhistamine modulates the effects of chronic stress on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunobiology.* 2015; 220(3):341–9.
9. Fitzgerald GK, McClure PW, Beattie P, Riddle DL. Issues in determining treatment effectiveness of manual therapy. *Phys Ther.* 1994; 74(3):227–33.
10. Krohn M, Listing M, Tjahjono G, Reissbauer A, Peters E, Klapp BF, Rauchfuss M. Depression, mood, stress, and Th1/Th2 immune balance in primary breast cancer patients undergoing classical massage therapy. *Support Care Cancer.* 2011; 19(9):1303–11.
11. Rapaport MH, Schettler P, Bresee C. A preliminary study of the effects of repeated massage on hypothalamic-pituitary-adrenal and immune function in healthy individuals: a study of mechanisms of action and dosage. *J Altern Complement Med.* 2012; 18(8):789–97.
12. Salgado ASI, Parreira RB, Santos IR, Urbano JJ, Fons P ca NT, BOnini P, Grosjean D. Effects of microkinesitherapie on heart rate variability. *Man Ther Posturology & Rehabil J.* 2013; 11:488–93.
13. Pereira A, Carvalho E, Knippers II, Furmann M, Pires J, Ribeiro L, et al. Assessment of heart rate variability in fibromyalgia after micro-physiotherapy. *Man Ther Posturology Rehabil J.* 2014; 12:191–5.
14. Menezes J. *Inteligência quantica - por um mundo melhor.* Rio de Janeiro: Novo ser; 110 p; 2006.
15. Palumbo ML, Canzobre MC, Pascuan CG, R T os H, Wald M, Genaro AM. The stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *J Neuroimmunol.* 2010; 218(1-2):12–20.
16. Beal MF, Mazurek MF, Tran VT, Chattha G, Bird ED, Martin JB. Reduced numbers of somatostatin receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Science.* 1985; 229(4710):289-91.
17. Licciardone JC, Fulda KG, Stoll ST, Gamber RG, Cage AC. A case-control study of osteopathic palpatory findings in type 2 diabetes mellitus. *Osteopath Med Prim Care.* 2007; 1:6.
18. Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, Geoffroy H, Dispersyn G, Langrume C, Ciret S, Gallopin T, Sauvet F. Effects of exercise on brain and peripheral inflammatory biomarkers induced by total sleep deprivation in rats. *J Inflamm (Lond).* 2015; 12:56.
19. Kuhn CM, Schanberg SM, Field T, Symanski R, Zimmerman E, Scafidi F, Roberts J. Tactile-kinesthetic stimulation effects on sympathetic and adrenocortical function in preterm infants. *J Pediatr.* 1991; 119(3):434–40.
20. Mathai S, Fernandez A, Mondkar J, Kanbur W. Effects of tactile-kinesthetic stimulation in preterms: a controlled trial. *Indian Pediatr.* 2001; 38(10):1091–8.
21. Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, Paus R. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol.

- FASEB J.
2005; 19(10):1332–4.
22. Marshall JS, Gomi K, Blennerhassett MG, Bienenstock J. Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoid-dependent mechanism. *J Immunol.* 1999; 162(7):4271–6.
23. Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EMJ, Paus R. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(8):1697–704.
24. Henricson M, Ersson A, MK K ttK S, Segesten K, Berglund AL. The outcome of tactile touch on stress parameters in intensive care: a randomized controlled trial. *Complement Ther Clin Pract.* 2008; 14(4):244–54.
25. Diego MA, Field T. Moderate Pressure Massage Elicits a Parasympathetic Nervous System Response. *Int J Neurosci.* 2009; 119(5):630–8.
26. Waters-Banker C, Butterfield TA, Dupont-Versteegden EE. Immunomodulatory effects of massage on nonperturbed skeletal muscle in rats. *J Appl Physiol.* 2014; 116(2):164–75.
27. Meltzer JC, MacNeil BJ, Sanders V, Pylypas S, Jansen AH, Greenberg AH, Nance DM. Contribution of the adrenal glands and splenic nerve to LPS-induced splenic cytokine production in the rat. *Brain Behav Immun.* 2003; 17(6):482–97.
28. MacNeil BJ, Jansen AH, Greenberg AH, Nance DM. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *Am J Physiol.* 1996; 270(2):64–70.
29. Olausson H, Cole J, Rylander K, McGlone F, Lamarre Y, Wallin BG, Kr K mer H, Wessberg J, Elam M, Bushnell MC, Vallbo A. Functional role of unmyelinated tactile afferents in human hairy skin: sympathetic response and perceptual localization. *Exp Brain Res.* 2008; 184(1):135–40.
30. Milne RJ, Foreman RD, Giesler GJ, Willis WD. Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. *Pain.* 1981; 11(2):163–83.
31. Craig AD. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3(8):655–66.
32. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet*