

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МХФ-15 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Нурашева Э.Е.¹, Тухватшин Р.Р.¹, Балабекова М.К.²

¹Кыргызско-Российский славянский университет, Бишкек, Кыргызская Республика, (720000, г. Бишкек, ул. Киевская, 44), elmirka_n@mail.ru;

²Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, Республика Казахстан (050050, Алматы, ул. Толе би, 88), balabekovamarina@mail.ru

В работе проведена оценка эффективности воздействия МХФ-15 на состояние иммунной системы, системы крови и высшей нервной деятельности старых крыс. Под влиянием МХФ-15 в периферической крови старых крыс уже на первые сутки исследования существенно скорректированы абсолютное содержание лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. Через 7 суток последовало восстановление нейтрофильной реакции крови. В оба срока исследования установлено повышение метаболической и поглотительной активности нейтрофилов. Под влиянием МХФ-15 в оба срока исследования существенно нарастает хелперная активность лимфоцитов. МХФ-15 существенно повышает вертикальную активность старых крыс в тесте «открытое поле». Под влиянием МХФ-15 существенно корректируется формирование безусловной реакции избегания яркого света, тогда как на консолидацию и воспроизведение временных связей РПИ, так же как и РАИ МХФ-15 не оказывает влияния. Под влиянием МХФ-15 у старых крыс существенно улучшаются пространственно-ориентировочные навыки.

Ключевые слова: старение, поведенческие реакции, иммунная система, крысы, эксперимент, клетки крови, иммуномодуляторы.

STUDY THE EFFECTIVENESS OF THE MXF-15 IN THE EXPERIMENT

Nurasheva E.E.¹, Tuchvatshin R.R.¹, Balabekova M.K.²

¹Kyrgyz Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic (720000, Bishkek, Kievskaya street 44), elmirka_n@mail.ru

²Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Republic of Kazakhstan (050050, Almaty, Tole bi street, 88), balabekovamarina@mail.ru

In this paper we evaluated the effectiveness of the impact of the MXF-15 on the immune system, blood system and higher nervous activity in old rats. Under the influence of the MXF -15 in peripheral blood of old rats already on the first day of the study essentially correct the absolute number of lymphocytes, monocytes and eosinophils. After 7 days, followed by restoration of blood neutrophil response. In both studies found an increase in the term metabolic and absorptive activity of neutrophils. Under the influence of the MXF -15 in both study period significantly increases the activity of helper lymphocytes. MXF-15 significantly increases the vertical activity of old rats in the test "open field". Under the influence of the MXF-15 significantly corrected formation unconditional avoidance of bright light, while the consolidation and reproduction of temporary connections RPA, as well as RAA MXF-15 has no effect. Under the influence of the MXF -15 in old rats significantly improves the spatial and orientation skills.

Keywords: aging, behavioral reactions, the immune system, rat, experiment, blood cells, immunomodulators.

Изучением вопросов старения и антистарения занято все прогрессивное человечество. Наступающее с возрастом истощение иммунной системы играет ключевую роль в снижении показателей здоровья и продолжительности жизни [3.4].

Иммунная и кроветворная система тесно взаимосвязаны, поскольку происходят от общих поливалентных стволовых клеток. Обе системы выполняют защитную роль от инфекционных агентов, предупреждают развитие в организме опухолей [1]. Однако с возрастом резервные возможности основного гемопоэза у животных и у человека могут сужаться и приводить к снижению способности реагировать на различные стрессорные воздействия [1].

В связи с этим настоящая работа была посвящена выявлению функциональных изменений кроветворной и иммунной систем, а также высшей нервной деятельности у старых крыс и разработке новых патогенетических путей коррекции выявленных нарушений.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 40 белых крысах-самцах массой 220–340 г., содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Проведены 2 серии экспериментов: 1 серия – старые интактные крысы; 2 серия – старые крысы, получавшие МХФ-15 в/м из расчета 50 мг/кг массы тела. Исследуемый препарат вводили на физиологическом растворе подкожно в объеме 0,5 мл в течение недели. МХФ-15 синтезирован в АО «Институт химии имени А.Б. Бектурова». Контрольная группа (интактные крысы) получала эквивалентный объем физиологического раствора. В каждой серии было по 20 крыс. Исследования проводили через одну и две недели от начала эксперимента. Забор крови у животных проводили под хлороформовым наркозом. Показатели иммунного статуса определяли с помощью методик по определению в крови: общего количества лейкоцитов, лейкоформулы (по общепринятой методике); спонтанного и индуцированного НСТ теста, спонтанного и индуцированного фагоцитоза [2]; неконъюгированных моноклональных антител к CD3-, CD4-, CD8- лимфоцитам крыс в медицинском центре «Иммунодиагностика».

Медико-биологические эксперименты и доклинические исследования на животных проводились согласно «Правилам проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан», утвержденным приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 25 июля 2007 года № 442 в соответствии с Госстандартом Республики Казахстан «Надлежащая лабораторная практика. Основные положения», утвержденным приказом Министра индустрии и торговли РК. Получено решение локальной этической комиссии КазНМУ.

Процедуры статистического анализа выполнялись с помощью ППП SPSS-16, STATISTIKA – 7. Для проверки совпадения распределения исследуемых количественных показателей с нормальным в группах был использован критерий согласия Колмогорова – Смирнова. Ввиду того, что закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, значимость различий проверена при помощи критерия Вилкоксона (в случае зависимых групп) и U-критерия Манна – Уитни (в случае независимых совокупностей). Различия считались значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Через 1 сутки после завершения лечения МХФ-15 установлено снижение на 45,3 % ($p=0,001$, $z=3,213$) сегментоядерных нейтрофилов против контроля, а к 7 суткам увеличение абсолютного и относительного содержания лимфоцитов на 15,6 % ($p=0,082$) и 13,1 %

($p=0,001$, $z=3,213$) соответственно, повышению ИИР на 62,1 % по сравнению с предыдущим сроком исследования и на 12,3 % по сравнению с интактными особями. Факторная модель, построенная на основе корреляционной матрицы, показала, что под влиянием МХФ-15 наибольшим изменениям подвергались следующие переменные, объединенные в фактор 1: абсолютное содержание лимфоцитов (векторная нагрузка +0,929), моноциты (векторная нагрузка +0,807) и эозинофилы (векторная нагрузка -0,796). Через 7 суток переменные, вошедшие в фактор 1, показали, что влияние МХФ-15 больше ассоциировано с нейтрофильной реакцией крови, с векторной нагрузкой для сегментоядерных +0,900, для палочкоядерных – +0,824. Во втором факторе большой вклад внесли такие показатели крови, как лимфоциты (векторная нагрузка +0,830), с которыми ассоциировано увеличение общих лейкоцитов (+0,955).

МХФ-15 оказал модулирующее влияние на показатели лимфоцитарного иммунитета. Через 1 сутки после окончания недельной коррекции у крыс, леченных МХФ-15, в 1,6 раз ($p=0,001$, $z=3,250$) возрастало среднее значение лимфоцитов с хелперной активностью, отмечалось увеличение цитотоксической активности лимфоцитов на 33,3 % ($p=0,003$, $z=2,948$) по сравнению с интактными старыми особями. Через неделю МХФ-15 вызывал повышение Т-хелперов на 37,5 % ($p=0,016$, $z=2,419$) и иммунорегуляторного индекса на 25 % ($p=0,002$, $z=3,024$).

Имеются различные толкования о том, какую смысловую нагрузку несет увеличение или уменьшение Treg у старых животных. Одни авторы считают, что с возрастом процент Т-клеток уменьшается, в частности цитотоксических Т-клеток, тогда как Т-хелперы увеличиваются [5]. Другие авторы придерживаются мнения о том, что Т-клеточная физиология стареющего организма обусловлена снижением их хелперно-супрессорной активности за счет изменения сигнальных путей стареющих Т-клеток [6.7]. По-видимому, объяснением тому служит «многофункциональность» CD8+ Т-клеток. С одной стороны CD8+ Т-клетки обладают рядом антимикробных эффекторных механизмов, которые являются менее заметными или отсутствуют в CD4 Th1 и Th17 Т-клетках [8]. CD8+ Т-клетки высвобождают цитокины или цитотоксические молекулы, которые вызывают апоптоз клеток-мишеней. С другой стороны, CD8+Т-клетки оказывают тормозные эффекты для CD4+Т-лимфоцитов.

Исследования кислородзависимых показателей микробицидности нейтрофилов в НСТ-тесте показали, что через 1 сутки после завершения лечения МХФ-15 индуцированная активность нейтрофилов повышалась в 1,6 раза ($p=0,0003$, $z=3,628$) по сравнению с нелеченными старыми особями. Спонтанный и индуцированный фагоцитоз в 1,2 ($p=0,017$, $z=2,381$) и 1,9 раз ($p=0,0002$, $z=-3,780$) статистически значимо превышал показатели нелеченных животных (рис.1).

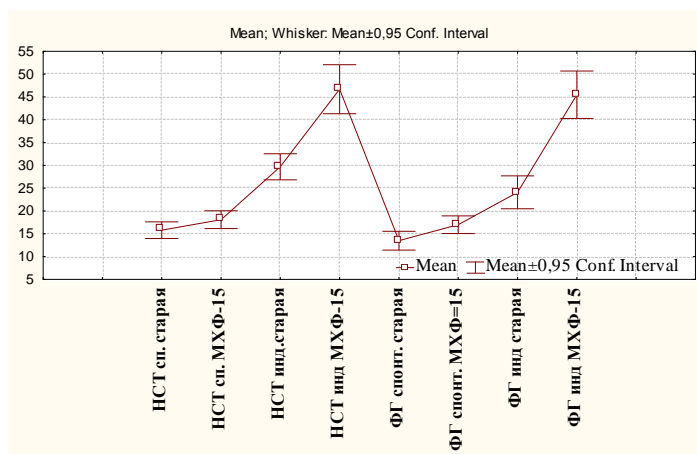


Рис.1. Сравнительная характеристика показателей метаболической и поглотительной активности нейтрофилов у старых крыс, леченных МХФ-15, в сравнении с интактными старыми (через 1 сутки)

Примечание: Mean – среднее; Mean±0.95 Conf. Interval – среднее±95 % ДИ

Через 7 суток под влиянием МХФ-15 отмечалось статистически значимое увеличение спонтанного и индуцированного вариантов НСТ-теста и фагоцитоза на 47,1 % ($p=0,001$, $z=3,213$), 96,4 % ($p=0,0002$, $z=3,742$), 49,2 % ($p=0,002$, $z=3,099$) и 100,4 % ($p=0,0002$, $z=3,780$) соответственно.

Исследование в тесте «открытое поле» поведенческих реакций старых крыс, в течение недели получавших МХФ-15, в оба срока исследования показало увеличение суммарной вертикальной двигательной активности ($p \leq 0,005$), сокращение в 1,7 акта «движение на месте» ($p=0,033$, $z=2,132$) по сравнению с интактными особями.

Статистически значимое сокращение латентного периода вхождения в темный отсек при выработке норкового рефлекса у старых крыс, леченных МХФ-15, по сравнению с нелеченными старыми особями составило 46,3 % ($p=0,002$, $z=-3,021$). Проверка РПИ показала, что под влиянием МХФ-15 у крыс последовал мотивированный «отказ» от вхождения в наказуемый темный отсек камеры, что указывало на то, что у старых крыс не сформировался рефлекс на безусловный раздражитель ($p=0,013$, $z=2,488$).

В тесте РАИ под влиянием МХФ-15 опытные крысы совершили 9 правильных реакций избегания, что в 2 раза статистически значимо ($p=0,0004$, $z=3,554$) превышало показатели нелеченных старых крыс. Однако во втором опытном сеансе МХФ-15 не оказывал заметного влияния на процессы консолидации временных связей РАИ.

Выработка навигационных навыков в водном лабиринте у старых крыс, леченных МХФ-15, показала, что поиск безопасной платформы у этих крыс занял 84 с. против 118,5 с контрольных старых. Во время проверки опытные крысы сократили время поиска платформы до 30 с, что было статистически значимо как по отношению к предыдущему

сроку ($p=0,0004$, $z=3,516$), так и к показателям нелеченных старых особей ($p=0,011$, $z=-2,532$).

Заключение

Таким образом, под влиянием МХФ-15 в периферической крови старых крыс уже на первые сутки исследования существенно скорректированы абсолютное содержание лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. Через 7 суток последовало восстановление нейтрофильной реакции крови. Между тем в оба срока исследования установлено повышение метаболической и поглотительной активности нейтрофилов. Под влиянием МХФ-15 в оба срока исследования существенно нарастает хелперная активность лимфоцитов. МХФ-15 существенно повышает вертикальную активность старых крыс в тесте «открытое поле». Под влиянием МХФ-15 существенно корректируется формирование безусловной реакции избегания яркого света, тогда как на консолидацию и воспроизведение временных связей РПИ, так же как и РАИ МХФ-15, не оказывает влияния. Под влиянием МХФ-15 у старых крыс существенно улучшаются пространственно-ориентировочные навыки.

Список литературы

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: в 2 т. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Наука, 2008. – Т.2. – 434 с.
2. Информативность тестов оценки иммунного статуса при инфекционных и аллергических заболеваниях // Методические рекомендации. НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней Минздрава Казахской ССР. – Алма-Ата, 1989. – 25 с.
3. Лекарства от старости. – 2-е изд., доп. / Михаил Батин. – М.: Изд-во И.В. Балабанова, 2007. – 64 с.: ил.
4. М. А. Пальцев, И. М. Кветной, В. О. Полякова, Т. В. Кветная, А. В. Трофимов. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения. Успехи геронтол. – 2009. – Т. 22. – № 1. – С. 24–36.
5. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, et al. (2007) Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128: 92–105.
6. Garcia GG, Miller RA. Age-related defects in CD4+ T cell activation reversed by glycoprotein endopeptidase. *Eur J Immunol*. 2003;33:3464–3472.
7. Garcia GG, Berger SB, Sadighi Akha AA, Miller RA. Age-associated changes in glycosylation of CD43 and CD45 on mouse CD4 T cells. *Eur J Immunol*. 2005;35:622–631.

8. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* (2008) 26:389–420. [1146/annurev.immunol.26.021607.090404](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404).

Рецензенты:

Пичхадзе Г.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы;

Шарипов К.О., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы.