

## ВЛИЯНИЕ КОРТЕКСИНА НА ЗАЩИТНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОВАРИЭКТОМИИ

Муфазалова Н.А.<sup>1</sup>, Марон А.Д.<sup>1</sup>, Муфазалова Л.Ф.<sup>1</sup>, Меньшикова И.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, e-mail: remann.90@mail.ru

В статье представлены данные о влиянии кортексина на функциональное состояние полиморфноядерных лейкоцитов и мононуклеарных фагоцитов у овариэктомированных крыс. Двухстороннюю овариэктомию проводили под легким эфирным наркозом. Ложнооперированным животным проводили аналогичную операцию без удаления яичников. Кортексин вводили в дозе 1 мг/кг внутримышечно в течение 10 дней, считая нулевым днем окончание 3-недельного срока наблюдения после операции. Определяли количество лейкоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (индуцированный НСТ-тест), микробицидную активность в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности (*Candida albicans*), содержание миелопероксидазы и катионных белков в нейтрофилах и мононуклеарных фагоцитах. Установлено, что применение кортексина существенно уменьшает негативное влияние овариэктомии на количественные и качественные показатели функциональной активности фагоцитов: устраняет лейкопению, восстанавливает активность кислородзависимого метаболизма и оксидантных механизмов микробицидности нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов.

Ключевые слова: двухсторонняя овариэктомия, полиморфноядерные лейкоциты, мононуклеарные фагоциты, кортексин, кислородзависимый метаболизм, микробицидная активность, миелопероксидаза, катионные белки.

## INFLUENCE OF CORTEXIN ON PROTECTIVE ACTIVITY OF PHAGOCYTES IN CONDITIONS OF OVARIECTOMY

Mufazalova N.A., Maron A.D., Mufazalova L.F., Menshikova I.A.

*Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: remann.90@mail.ru*

The article presents data on the influence of Cortexin on the functional state of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) and mononuclear phagocytes in ovariectomized female rats. Bilateral ovariectomy was performed under light ether anesthesia. Sham-operated animals got similar surgical access without removing ovaries. Cortexin was administered in a dose 1 mg/kg intramuscularly during 10 days, counting the end of the 3-week observation period after the operation as the day zero. Number of leukocytes in peripheral blood, intensity of oxygen-dependent metabolism (induced HBT-test), microbicidal activity (against fungi *Candida albicans*) in conditions of functioning and blockade of mechanisms of oxidative killing by sodium azide, as well as myeloperoxidase content and cationic proteins in of PMNL and mononuclear phagocytes were assessed. The use of Cortexin significantly reduces the negative impact of the ovariectomy on quantitative and qualitative indicators of the functional activity of phagocytes: removes leukopenia, restores the activity of oxygen-dependent metabolism and oxidant microbicidal mechanisms of neutrophils and mononuclear phagocytes.

Keywords: bilateral ovariectomy, polymorphonuclear leukocytes, mononuclear phagocytes, Cortexin, oxygen-dependent metabolism, microbicidal activity, myeloperoxidase, cationic proteins.

Все большее внимание исследователей привлекает проблема нарушения нейроиммуноэндокринного гомеостаза и возможности его коррекции при различных патологических состояниях. Данные многочисленных экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о развитии целого комплекса нарушений в условиях гипозстрогенемии, в том числе наблюдается нарушение психоневрологического статуса и дисфункция иммунной системы [1-5]. Формирование тревожно-депрессивных расстройств, снижение когнитивных функций, нарушение процессов обучения и памяти, повышение частоты развития нейродегенеративных заболеваний при депривации эстрогенов

обусловлены тем, что эстрогены непосредственно участвуют в процессах нейрогенеза, нейропротекции, в регуляции поведенческой и нейроэндокринной функций центральной нервной системы, модулируют функциональное состояние ядер гипоталамуса, гормонпродуцирующую функцию аденогипофиза и т.д. [3, 5-7]. О важности влияния эстрогенов на активность клеток ЦНС свидетельствует высокий уровень эстрадиола в ЦНС, который поддерживается не только за счет циркулирующих гормонов, но и локального синтеза эстрадиола с помощью ароматазы, содержащейся в мозге в большом количестве [3, 6].

С другой стороны, хорошо известна важная роль нейроэндокринной регуляции в процессах иммуногенеза. В условиях депривации эстрогенов нарушается функциональная активность фагоцитов – клеток, которые не только обеспечивают первую линию защиты организма от повреждающих факторов внешней среды, противоифекционную и противоопухолевую резистентность, процессы иммуногенеза, участвуют в нейроэндокринной регуляции адаптивных реакций, но и чутко реагируют на малейшие изменения физиологического состояния организма [2,4,5,8,9,11]. Это позволяет использовать фагоцитарные реакции в качестве интегрального показателя состояния иммунной системы [4,11,12].

В связи с вышеизложенным представляет интерес возможность коррекции нейроиммуноэндокринных нарушений психотропными препаратами с иммунотропной активностью. Нами изучено влияние кортексина, обладающего нейропротекторным и иммуномодулирующим действием [7,13], на защитную активность полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и перитонеальных макрофагов (ПМФ) у овариэктомированных самок крыс.

### **Материалы и методы исследования**

Эксперименты выполнены на 60 белых половозрелых неинбредных крысах-самках массой 180-200 г. Двухстороннюю овариэктомию проводили под легким эфирным наркозом [5]. Ложнооперированным животным производился аналогичный доступ без удаления яичников. Контроль за эффективностью кастрации осуществляли микроскопией влажных мазков на протяжении трех недель. В течение всего периода наблюдения клеточный состав мазков оставался неизменным и соответствовал фазе межтечки.

Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа - контроль (интактные животные), 2-я группа – ложнооперированные животные (Ложн/опер), 3-я группа – овариэктомированные животные (Овар/эк) и 4-я группа - овариэктомированные животные, получавшие кортексин (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия, г. Санкт-Петербург) (Овар/эк+Корт) в дозе 1 мг/кг внутримышечно в течение 10 дней [14], считая нулевым днем окончание 3-

недельного срока наблюдения после операции.

Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом, на стандартной диете лабораторных животных (ГОСТР 50258-92), с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ З 51000.3-96 и 51000.4-96) и согласно Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP).

Определяли количество лейкоцитов в периферической крови, интенсивность кислородзависимого метаболизма (спонтанный и индуцированный НСТ-тест), антимикробную активность ПМЯЛ и ПМФ в условиях функционирования и блокады (азидом натрия) кислородзависимых факторов микробицидности в отношении грибов *Candida albicans*, активность миелопероксидазы (МП) и содержание катионных белков (КБ) в ПМЯЛ и ПМФ [15].

Результаты НСТ-теста оценивали после 30 минут инкубации суспензии ПМЯЛ в 0,1%-ном растворе нитросинего тетразолия (Chemapol) морфологическим методом. В мазках определяли процент активных клеток (содержащих гранулы восстановленного диформаза) и индекс активации (степень активации в перераспределении на 1 фагоцит). Показатели вычисляли для интактной суспензии фагоцитов (спонтанный НСТ-тест) и в процессе фагоцитоза частиц латекса (индуцированный НСТ-тест).

Антимикробную активность определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) микробов (*C. albicans*, штамм 2), выросших через 3 суток на среде высева. Контролем служил высев микроба из среды реакции, не содержащей фагоцитирующих клеток (ПМЯЛ, ПМФ). Инактивирующую активность фагоцитов выражали в процентах микробных клеток, инактивированных фагоцитами (индекс инактивации, ИИ).

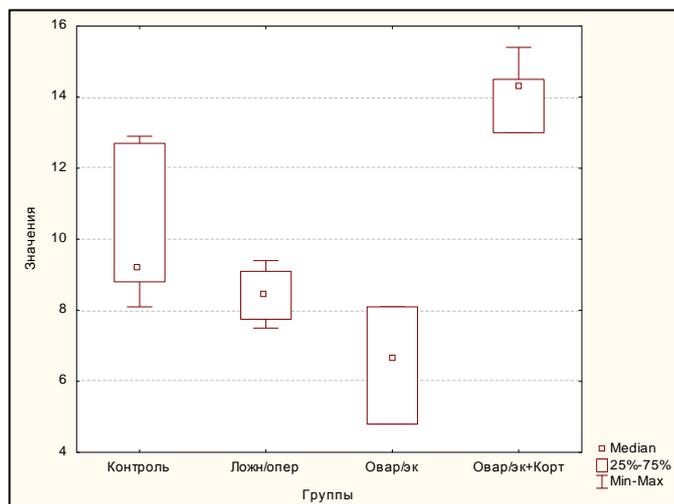
Активность МП и КБ оценивали по интенсивности окраски (пользуясь 5-балльной шкалой), вычисляли процент активных клеток в мазке (ПА) и средний цитохимический коэффициент (СЦК) по G. Astaldi, L. Verga:  $СЦК = (1a + 2b + 3c + 4d) / 100$ , где 0-4 – интенсивность окраски, а, в, с, d – количество ПМЯЛ (ПМФ) с соответствующей интенсивностью окраски [8]. Результаты регистрировали на следующий день после окончания введения кортексина (11-е сутки).

Статистическую обработку проводили с использованием методов вариационной статистики [16], пакета программ Statistica 8.0. Проверку на нормальность распределения данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Вилка. Оценку значимости различий проводили, вычисляя медиану и межквартильный интервал. Дисперсионный анализ

проводили с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса, для множественных сравнений использован Q-критерий Дана. Критический уровень значимости  $p$  для статистических критериев принимали равным 0,05. Данные в тексте представлены в процентах к контролю (неинбредные животные).

### Результаты и обсуждение

У овариэктомированных животных на 32-й день после операции было выявлено снижение числа лейкоцитов в периферической крови (до 71,74% по отношению к контролю) (рис. 1). Наблюдалось подавление оксидантных механизмов микробицидности. Об этом свидетельствовало увеличение числа КОЕ *S. albicans* (до 139,19%,  $p=0,0003$ ), сопровождавшееся снижением активности МП в ПМЯЛ и интенсивности кислородзависимого метаболизма этих клеток. Так, процент МП-положительных клеток составил 61,54% ( $p=0,0292$ ), а СЦК – 59,70% ( $p=0,0050$ ), т.е. почти на 40% по сравнению с аналогичными показателями у интактных и ложнооперированных животных (рис. 2 А, Б).



*Рис. 1. Влияние кортексина на содержание лейкоцитов у экспериментальных животных в условиях овариэктомии*

Также наблюдалось снижение интенсивности образования активных форм кислорода (АФК), не достигавшее, однако, статистической значимости (индуцированный НСТ-тест): процент активных клеток составил 85,71%, а индекс активации – 72,22%. В результате ИИ ПМЯЛ в группе Овар/эк составил 79,65%. Полученные данные свидетельствуют о нарушении активности как пероксидазозависимых, так и пероксидазозависимых механизмов микробицидности нейтрофильных гранулоцитов в условиях гипоэстрогемии, а также при воздействии других повреждающих факторов, что согласуется с данными других авторов [1,2,4,17].

Выявлено подавление неоксидантных факторов микробицидности ПМЯЛ у

овариэктомированных животных: число КОЕ возросло до 136,52% ( $p=0,0097$ ), в результате чего ИИ составил 69,53%. Это сопровождалось снижением содержания КБ в ПМЯЛ: процент КБ-позитивных клеток уменьшился в 4 раза (до 24,31% по сравнению с интактными ( $p=0,008$ ) и ложнооперированными животными ( $p=0,00002$ )) (рис. 3 А, Б).

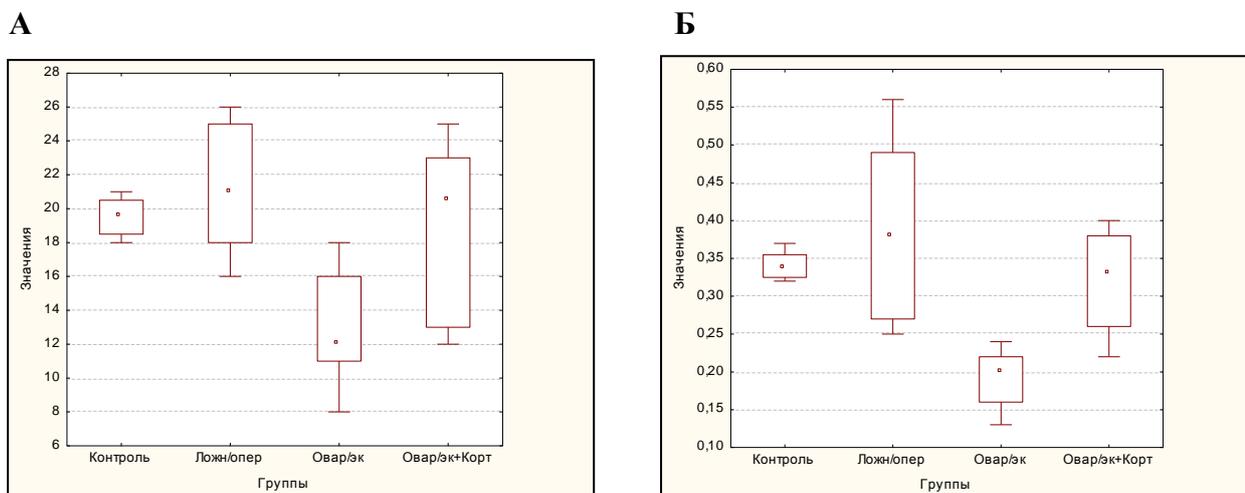


Рис. 2. Влияние кортексина на активность миелопероксидазы в ПМЯЛ у экспериментальных животных в условиях овариэктомии: А – процент активных клеток, Б – средний цитохимический коэффициент

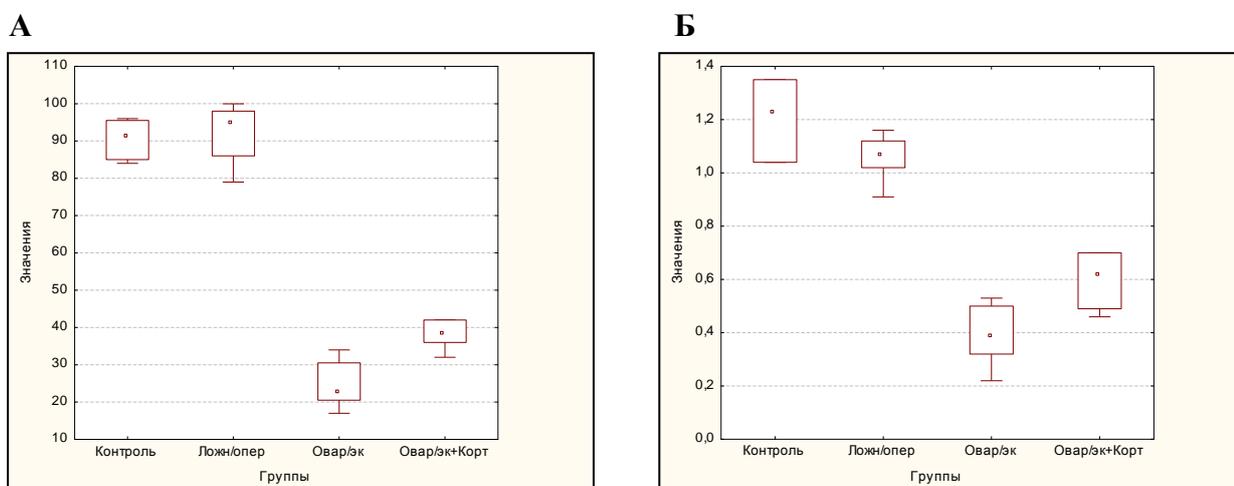


Рис. 3. Влияние кортексина на содержание катионных белков в ПМЯЛ у экспериментальных животных в условиях овариэктомии: А – процент активных клеток, Б – средний цитохимический коэффициент

У овариэктомированных крыс наблюдалось падение фунгицидной активности мононуклеарных фагоцитов в условиях как функционирования, так и блокады кислородзависимых факторов биоцидности, не достигавшее, однако, статистической значимости (ИИ составил 61,84% и 59,95% соответственно). Это сопровождалось

значительным подавлением интенсивности кислородзависимого метаболизма ПМФ (индуцированный НСТ-тест): процент активных клеток снизился до 67,24% ( $p=0,0084$  по сравнению с интактными животными и  $p=0,0013$  по сравнению с группой ложнооперированных крыс), индекс активации – до 64,52% ( $p=0,0288$  по сравнению с контролем и  $p=0,0013$  по сравнению с группой Ложн/опер). При цитохимическом исследовании не было выявлено снижения активности МП и КБ в ПМФ. Полученные данные свидетельствуют о подавлении пероксидазозависимых оксидантных факторов биоцидности мононуклеарных фагоцитов в условиях депривации эстрогенов, что согласуется с известными данными об активирующем влиянии эстрогенов на функциональную активность макрофагов и подавление ИЛ-1 [4,18].

Применение кортексина полностью устраняло лейкопению, вызванную овариэктомией (рис. 1). Также восстанавливалась активность оксидантных механизмов киллинга ПМЯЛ: число КОЕ снизилось до 120,27% ( $p=0,6805$ ), ИИ составил 91,52%. Важно отметить, что использование кортексина восстанавливало активность МП в ПМЯЛ: процент МП-позитивных клеток составил 105,13% ( $p=1,0000$  при сравнении с контролем, и  $p=0,0378$  при сравнении с группой овариэктомированных животных), а СЦК - 98,51% (по отношению к интактным животным,  $p=1,0000$ ) (рис. 2 А, Б). Кортексин повышал (достоверно по отношению к группе овариэктомированных крыс) активность пероксидазозависимых микробицидных систем ПМЯЛ, о чем свидетельствовало увеличение образования АФК (индуцированный НСТ-тест): процент активных клеток составил 117,86% ( $p=1,0000$  по сравнению с интактными животными и  $p=0,0189$  по сравнению с группой овариэктомированных крыс), индекс активации – 116,67% ( $p=0,5545$  по сравнению с контролем и  $p=0,0005$  по сравнению с группой овариэктомированных крыс). Следовательно, кортексин нормализовал активность как пероксидазозависимых, так и пероксидазозависимых микробицидных систем нейтрофилов при гипозэстрогемии.

Вместе с тем кортексин не устранял депрессию неоксидантных механизмов фунгицидности ПМЯЛ - ИИ составил 73,67% (КОЕ – 131,56%,  $p=0,2978$ ). Об этом же свидетельствовал и сохраняющийся низкий уровень КБ в ПМЯЛ (рис. 3 А, Б).

В группе овариэктомированных крыс, получавших кортексин, активность оксидантных микробицидных систем ПМФ не отличалась от таковой у интактных и ложнооперированных животных, о чем свидетельствовало уменьшение числа КОЕ (до 113,91% ( $p=1,0000$  по сравнению с контролем и  $p=1,0000$  по сравнению с группой ложнооперированных животных). Это сопровождалось полным восстановлением продукции АФК мононуклеарными фагоцитами (индуцированный НСТ-тест): процент активных клеток составил 82,76% ( $p=0,3662$  по сравнению с интактными животными и  $p=0,0687$  по

сравнению с группой ложнооперированных крыс), индекс активации – 87,10% ( $p=1,0000$  по сравнению с контролем и  $p=0,1904$  по сравнению с группой ложнооперированных животных). Активность МП в макрофагах не отличалась от таковой у интактных животных.

Применение кортексина статистически значимо (по сравнению с группами ложнооперированных и овариэктомированных животных) повышало активность неоксидантных механизмов микробицидности ПМФ: число КОЕ составило 68,42% ( $p=0,0019$  по сравнению с группой ложнооперированных животных и  $p=0,00002$  по сравнению с группой овариэктомированных крыс), ИИ возрос почти на 50% по сравнению с группой овариэктомированных животных и на 30% - по сравнению с группой ложнооперированных крыс и составил 118,37% (по отношению к контролю).

### **Выводы**

Таким образом, использование кортексина существенно уменьшает негативное влияние овариэктомии на количественные и качественные показатели функциональной активности фагоцитов: устраняет лейкопению, восстанавливает интенсивность кислородзависимого метаболизма, активность оксидантных микробицидных систем. Полученные данные подтверждают взаимозависимость состояния иммунной и эндокринной систем и обосновывают необходимость дальнейшего поиска возможных путей фармакологической коррекции нарушений иммуно-эндокринного гомеостаза в условиях гипоэстрогемии.

### **Список литературы**

1. Савочкина Ю.В. Патологические изменения в организме женщины в результате хирургической менопаузы // Охрана материнства и детства. – 2005. - № 1 (6). – С. 66-72.
2. Doucet D.R. Estrogenic hormone modulation abrogates changes in red blood cell deformability and neutrophil activation in trauma hemorrhagic shock / D.R. Doucet, R.P. Bonitz, R. Feinman [et al.] // J. Trauma.- 2010 Jan; 68 (1): 35-41. doi: 10.1097/TA.0b013e3181bbbdbb.
3. Galea L.A. Endocrine regulation of cognition and neuroplasticity: Our pursuit to unveil the complex interaction between hormones, the brain, and behavior / L.A. Galea, K.A. Uban, J.R. Epp [et al.] // Canadian Journal of Experimental Psychology. – 2008. – Vol. 62, № 4. – P. 247-260. doi: 10.1037/a0014501.
4. Khan D. Estrogen and signaling in the cells of immune system / D. Khan, C. Cowan, S.A. Ahmed // Advances in Neuroimmune Biology. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 73-93.
5. Naderi V. Estrogen provides neuroprotection against brain edema and blood brain barrier disruption through both estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  following traumatic brain injury / V. Naderi, M.

Khaksari, R. Abbasi [et al.] // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. – 2015. – Vol. 18, № 2. – P. 138-144.

6. Карева Е.Н. Эстрогены и головной мозг / Е.Н. Карева, О.М. Олейникова, В.О. Панов [и др.] // *Вестник РАМН*. – 2012. – № 2. – С. 48-59.

7. Nikitina V.B. Influence of Cortexin on parameters of immunity in patients with organic Asthenic disorder / V.B. Nikitina, E.M. Epanchintseva, T.P. Vetlugina [et al.] // *European Neuropsychopharmacology. Conference: 21st ECNP Congress Barcelona Spain. Conference Start: 20080830 Conference End: 20080903. Conference Publication: (var.pagings)*. – 2008. - №18 (S4) – P. S586-S587.

8. Баев Д.А. Оценка эффективности физических методов гемостаза и диссекции при операциях на органах брюшной полости (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 2012. – 24 с.

9. Муфазалова Н.А. Повреждающее воздействие дихлорэтана на морфофункциональное состояние фагоцитов / Н.А. Муфазалова, И.А. Меньшикова, Ф.Х. Камилов, Л.Ф. Муфазалова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2017. – № 2. - URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26249> (дата обращения: 06.04.2017).

10. Jablonska J. Neutrophil, quo vadis? / J. Jablonska, Z. Granot // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2017. - V. 102. - September 2017. - doi:10.1189/jlb.3MR0117-015R.

11. Nauseef W.M. Neutrophils at work / W.M. Nauseef, N. Borregaard // *Nature immunology*. – 2014. – Vol. 15, № 7. – P. 602-611. doi: 10.1038/ni.2921.

12. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities // *Nature reviews immunology*. – 2006. – Vol. 6. – P. 173-182. doi: 10.1038/nri1785.

13. Yakovlev A.A. Molecular partners of Cortexin in the brain / A.A. Yakovlev, N.V. Gulyaeva // *Neurochem. J.* – 2017. – V. 11. – P. 115–119. doi:10.1134/S1819712416040164.

14. Оганова Г.М. Влияние кортексина на выживаемость крыс при адреналиновой тахикардии / Г.М. Оганова, К.Х. Саркисян, М.Н. Ивашев [и др.] // *Современные наукоемкие технологии*. – 2012. – № 12. – С. 46-46.

15. Ягода А.В. Клиническая цитохимия / под ред. А.В. Ягоды, Н.А. Локтева. – Ставрополь, 2005. – 485 с.

16. Гареев Е.М. Основы математико-статистической обработки медико-биологической информации. – Уфа: Изд-во ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет Роздрава», 2009. – 346 с.

17. Муфазалова Н.А. Влияние нанодисперсной аморфной формы кальция глюконата и ее комбинации с рыбьим жиром на функциональное состояние нейтрофилов при интоксикации дихлорэтаном / Н.А. Муфазалова, И.А. Меньшикова, Ф.Х. Камилов и др. // *Современные проблемы науки и образования*. – 2017. – № 3.; URL: [https://science-](https://science-education.ru/ru/article/view?id=26249)

[education.ru/ru/article/view?id=26358](http://education.ru/ru/article/view?id=26358).

18. Giannoni E. Estradiol and Progesterone Strongly Inhibit the Innate Immune Response of Mononuclear Cells in Newborns / E. Giannoni, L. Guignard, M.K. Reymond [et al.] // *Infection and immunity*. - 2011. - Vol. 79, No. 7. - P. 2690–2698. doi:10.1128/IAI.00076-11.