

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО АЛЛОГЕННОГО ПРОЦЕССА И ЕЕ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ЭТИОЛОГИИ БОЛИ

Овсянников В.Г.¹, Торопкина Ю.Е.¹, Матросов В.И.², Егорова А.С.³, Алексеева Н.А.¹, Алексеева Н.С.¹, Алексеев В.В.¹, Бойченко А.Е.¹

¹ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: okt@rostgmu.ru;

²ГБУЗ Ставропольского края «Ставропольский краевой специализированный центр лечебной физкультуры и спортивной медицины», Ставрополь, e-mail: drmatrosov@yandex.ru;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: moromu80@yandex.ru

Системе врожденного иммунитета со стороны исследователей, несомненно, уделяется меньше внимания, нежели механизмам адаптивного иммунитета. Вместе с тем именно факторы врожденного иммунитета наиболее оперативно и достаточно эффективно обеспечивают защиту организма прежде всего от инфекции. Поддержание системы врожденного иммунитета в состоянии постоянной функциональной готовности – важнейшее условие сохранения гомеостаза организма, а потому она перманентно получает стимулы, которые активируют ее. Сегодня уже не возникает сомнений в том, что эти стимулы не обязательно должны быть антигенной природы. В литературе накоплено достаточно сведений об активации факторов врожденного иммунитета под влиянием физических, химических, а также психогенных воздействий. Среди них особое место занимает острая боль. Она выполняет не только сигнальную, но и мобилизующую функцию. Последняя касается и клеточных, и гуморальных факторов иммунитета. Проведенные в последние два десятилетия исследования показали, что эксцессы острой боли сопровождаются активацией факторов врожденного иммунитета, и, хотя реакция носит односторонний вектор, она имеет свои особенности в зависимости от вида боли. В представленной работе освещены особенности изменения активности лизоцима в зависимости от вида острой боли, воздействовавшей на организм.

Ключевые слова: факторы врожденного иммунитета, лизоцим, нейропатическая боль, висцеральная боль, соматическая боль.

LYSOCYME ACTIVITY IN THE DYNAMICS OF THE ACUTE ALLOGENIC PROCESS AND ITS DEPENDENCE ON THE ETIOLOGY OF PAIN

Ovsyannikov V.G.¹, Toropkina Yu.E.¹, Matrosov V.I.², Egorova A.S.³, Alekseeva N.A.¹, Alekseeva N.S.¹, Alekseev V.V.¹, Boychenko A.E.¹

¹FGBOU VO «Rostov State Medical University Ministry of Health of Russia» Rostov-on-Don, e-mail: okt@rostgmu.ru;

²GBUZ Stavropol Territory «Stavropol Regional Specialized Center for Physical Therapy and Sports Medicine», Stavropol, e-mail: drmatrosov@yandex.ru;

³FGBU «National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: moromu80@yandex.ru

The researchers pay incomparably less attention to the system of innate immunity than to the mechanisms of adaptive immunity. At the same time, it is the factors of innate immunity that most quickly and effectively protect the body from infection. Maintaining the innate immunity system in a constant state of functional readiness is the most important preservation of the body's homeostasis and therefore it permanently receives activating incentives. Nowadays there is no longer any doubt that these stimuli should not necessarily be of antigenic nature. The literature has accumulated enough information about the activation of innate immunity under physical, chemical, and psychogenic conditions. Acute pain occupies a special place among them. It carries on itself not only a signaling, but also a mobilizing function. The last one applies to both cellular and humoral immunity factors. Studies carried out in the last two decades have shown that the excesses of an acute illness are accompanied by factors of innate immunity. The presented work highlights the features of the change in the activity of lysozyme, depending on the type of acute pain, the effect on the body.

Keywords: factors of innate immunity, lysozyme, neuropathic pain, visceral pain, somatic pain.

На сегодняшний день очевидно, что раздражители, не несущие антигенную информацию, воздействуя на организм, способны изменять функциональную активность его факторов врожденного иммунитета [1, 2]. Также неоднократно в литературе встречаются упоминания об активации факторов врожденного иммунитета, в том числе лизоцима, в течении аутоиммунных заболеваний, а именно при повреждении тканей организма иммунными комплексами, а в дальнейшем – и при высвобождении факторов неспецифической резистентности [3, 4].

Боль в этом отношении не является исключением: во-первых, как субъективное чувство, сопровождающееся реакцией органов и систем, в том числе нервной и эндокринной; во-вторых, в силу причин своего возникновения, значительная часть которых не имеет иммунологической основы. Особенно это касается острой боли.

При общей однонаправленности изменений имеются отличия в конфигурации ответа на острую соматическую, висцеральную и нейропатическую боль. В доступной литературе анализа особенностей изменения лизоцима при различных видах боли нами не выявлено, что позволило обосновать актуальность нашего исследования.

Цель исследования – установить возможность и особенности вовлечения лизоцима в аллогенный процесс.

Задачи исследования:

1. Изучить реакцию лизоцима на острую соматическую боль.
2. Изучить реакцию лизоцима на острую висцеральную боль.
3. Изучить реакцию лизоцима на острую нейропатическую боль.

Материал и методы исследования

В основу работы положен материал экспериментальных исследований. Опыты производились на взрослых белых крысах-самцах. Первую группу составили интактные животные (контрольная группа) (n=20). У животных второй группы воспроизводили острую соматическую боль (n=15). Животным третьей группы наносилось раздражение, вызывающее острую висцеральную боль (n=10). У животных четвертой группы моделировали острую нейропатическую боль (n=10).

В каждой опытной группе животные подвергались аллогенному воздействию с последующим забором у них исследуемой крови через 2, 30, 60, 120 и 180 мин после болевого эксцесса.

Острая боль (ОБ) 3–4-й степени в соответствии с критериями А.В. Вальдмана, Ю.Н. Васильева в модификации В.Г. Овсянникова [5] воспроизводилась нанесением электрораздражения на прикорневую зону хвоста крысы, прямую кишку и отпрепарированный седалищный нерв.

Острая боль одинаковой интенсивности для каждого ее вида достигалась путем эмпирического манипулирования параметрами электротока, генерируемого электростимулятором ЭЧС-2. Критериями достижения боли являлись поведенческие и вегетативные реакции животных.

Пробы крови центрифугировались в течение 20 мин при 1500 об/мин.

Активность лизоцима в сыворотке определялась методом нефелометрии (В.Г. Дорофейчук, 1968) [6].

Критерием активности лизоцима является изменение интенсивности регистрируемого светового потока при прохождении через взвесь микрококка опытной пробы по отношению к исходной. Суточную культуру *M. lysodeiticus* смывают с агаровой среды, подвергают фильтрации и стандартизируют на фотоэлектрокалориметре (ФЕК-56) в кювете с рабочей длиной 3 мм. В работе используется светофильтр с пропусканием луча длиной 540 мкм. Исследовалась сыворотка в разведении взвесью микрококка 1:50. Смесь термостатируется в течение 1 ч при $t=37^{\circ}\text{C}$, после чего вновь нефелометрируется. По разности показателей судят об активности лизоцима.

Содержание животных и манипуляционные действия над ними осуществлялись в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

При исследовании и трактовке цифрового материала применяли статистический анализ данных с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2010 Pro, STATISTICA 10.0. Для рядов, не включающих нормальные значения, рассчитываются: медиана (Me), квантили ($Q_{0,25}$ – нижняя квантиль, $Q_{0,75}$ – верхняя квантиль), интервал определения медианных значений (Me) минимального значения (Min) до максимального (Max). Оценивали нормальность распределения полученных данных по критериям Колмогорова–Смирнова и поправки к ним Лиллиефорса. Сравнение данных, не подчиняющихся нормальному закону, проводили на основе U -критерия Манна–Уитни. Критическое значение уровня значимости (p) будет приниматься равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование активности лизоцима у интактных крыс имеет следующие цифровые характеристики: $Me_{\text{лиз}} = 0,264$ ед [$Q_{0,25} = 0,239$ ед; $Q_{0,75} = 0,299$ ед], $Min = 0,115$ ед, $Max = 0,307$ ед.

Эти результаты приняты нами как контрольные значения, и с ними проводилось сравнение всех последующих экспериментов.

При воспроизведении острой соматической боли активность лизоцима через 2 мин после начала эксперимента: $Me_{\text{лиз}}=0,473$ ед [$Q_{0,25} - 0,396$ ед; $Q_{0,75} - 0,485$ ед], $Min - 0,338$ ед, $Max - 0,502$ ед.

По истечении 30 мин от начала эксперимента $Me_{\text{лиз}}=0,389$ ед [$Q_{0,25} - 0,371$ ед; $Q_{0,75} - 0,4812$ ед], $Min - 0,309$ ед, $Max - 0,426$ ед.

Через 1 ч $Me_{\text{лиз}}=0,175$ ед [$Q_{0,25} - 0,134$ ед; $Q_{0,75} - 0,273$ ед], $Min - 0,101$ ед, $Max - 0,322$ ед.

Спустя 2 ч от момента болевого раздражения $Me_{\text{лиз}}=0,102$ ед [$Q_{0,25} - 0,085$ ед; $Q_{0,75} - 0,188$ ед], $Min - 0,031$ ед, $Max - 0,375$ ед.

По завершении эксперимента $Me_{\text{лиз}}=0,106$ ед [$Q_{0,25} - 0,091$ ед; $Q_{0,75} - 0,131$ ед], $Min - 0,076$ ед, $Max - 0,208$ ед.

На представленном графике (рис. 1) видно, что аллогенное воздействие вызвало рост активности лизоцима, она сохранялась в течение получаса, показатели имеют статистически высокосignificant различие по сравнению с контролем.

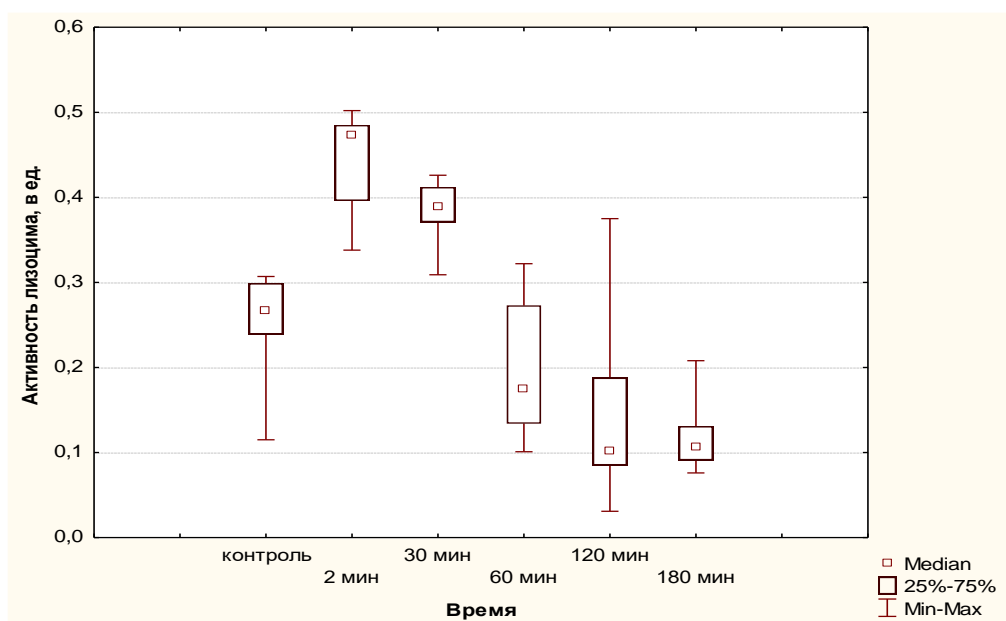


Рис. 1. Динамика изменения активности лизоцима при острой соматической боли

Выявленная реакция не носит стойкого характера. Уже через 1 ч активность лизоцима падает, а в последующие 2 ч становится ниже исходной, и это падение по сравнению с контролем статистически высокосignificant.

Таким образом, острая соматическая боль сопровождается резким ростом активности лизоцима, реакция непродолжительна и быстро сменяется депрессией.

При изучении эффектов острой висцеральной боли через 2 мин после болевого раздражения $Me_{\text{лиз}}=0,263$ ед, [$Q_{0,25} - 0,229$ ед; $Q_{0,75} - 0,284$ ед] $Min - 0,183$ ед, $Max - 0,305$.

По истечении 30 мин после аллогенного воздействия $Me_{\text{лиз}}=0,333$ ед [$Q_{0,25} - 0,310$ ед; $Q_{0,75} - 0,380$ ед] $Min - 0,285$ ед, $Max - 0,410$ ед.

Спустя 1 ч $Me_{\text{лиз}}=0,299$ ед [$Q_{0,25} - 0,280$ ед; $Q_{0,75} - 0,304$ ед] $Min - 0,251$ ед, $Max - 0,310$ ед.

Через 2 ч активность лизоцима характеризуется следующими значениями: $Me_{\text{лиз}}=0,275$ ед [$Q_{0,25} - 0,233$ ед; $Q_{0,75} - 0,290$ ед] $Min - 0,185$ ед, $Max - 0,301$ ед.

В конце эксперимента, т.е. через 3 ч, $Me_{\text{лиз}}=0,259$ ед [$Q_{0,25} - 0,231$ ед ; $Q_{0,75} - 0,291$ ед] $Min - 0,181$ ед, $Max - 0,320$ ед. Результаты представлены на рисунке 2.

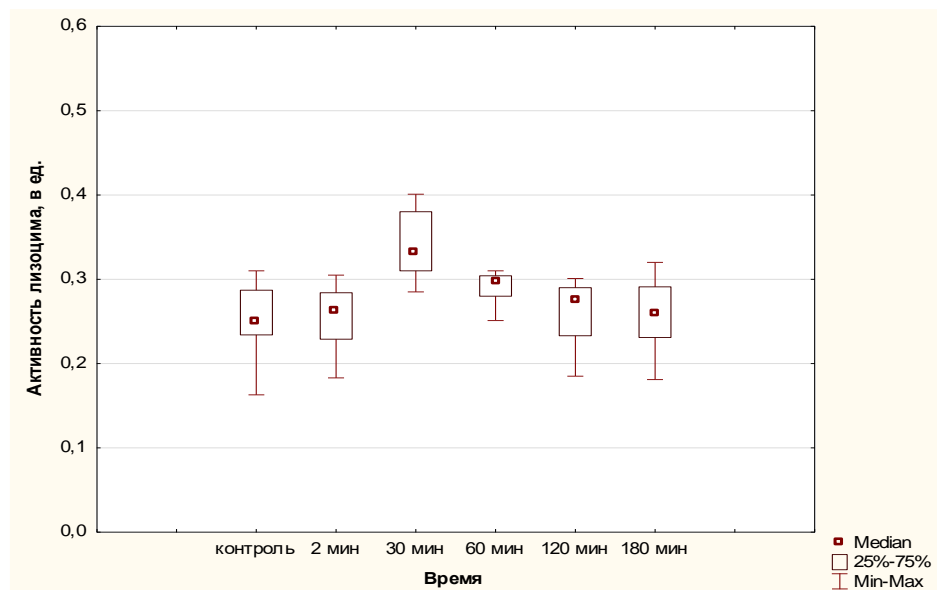


Рис. 2. Динамика изменения активности лизоцима при острой висцеральной боли

Таким образом, анализ цифрового материала наглядно демонстрирует, что возникшее через 30 мин увеличение активности лизоцима статистически высокозначимо отличается от исходного уровня, и только через 1 ч наблюдается легкая тенденция снижения активности почти до исходного уровня, а далее показатели не имеют статистически значимых отклонений от контрольных значений.

При воспроизведении острой нейропатической боли через 2 мин после электрораздражения седалищного нерва $Me_{\text{лиз}}=0,498$ ед [$Q_{0,25} - 0,489$ ед; $Q_{0,75} - 0,522$ ед] $Min - 0,483$ ед, $Max - 0,534$ ед. Резкое повышение активности лизоцима сохраняется в течение 2 ч.

Через 30 мин $Me_{\text{лиз}}=0,504$ ед [$Q_{0,25} - 0,496$ ед; $Q_{0,75} - 0,520$ ед] $Min - 0,484$ ед, $Max - 0,531$ ед.

Через 60 мин $Me_{\text{лиз}}=0,491$ ед [$Q_{0,25} - 0,489$ ед; $Q_{0,75} - 0,505$ ед] $Min - 0,422$ ед, $Max - 0,597$ ед.

Через 2 ч после болевого воздействия

$Me_{\text{лиз}}=0,487$ ед [$Q_{0,25} - 0,478$ ед; $Q_{0,75} - 0,501$ ед] Min – 0,430 ед, Max – 0,507 ед.

В течение 3-го ч наблюдается критическое снижение активности фермента $Me_{\text{лиз}}=0,299$ ед [$Q_{0,25} - 0,284$ ед; $Q_{0,75} - 0,318$ ед] Min – 0,257 ед, Max – 0,332 ед.

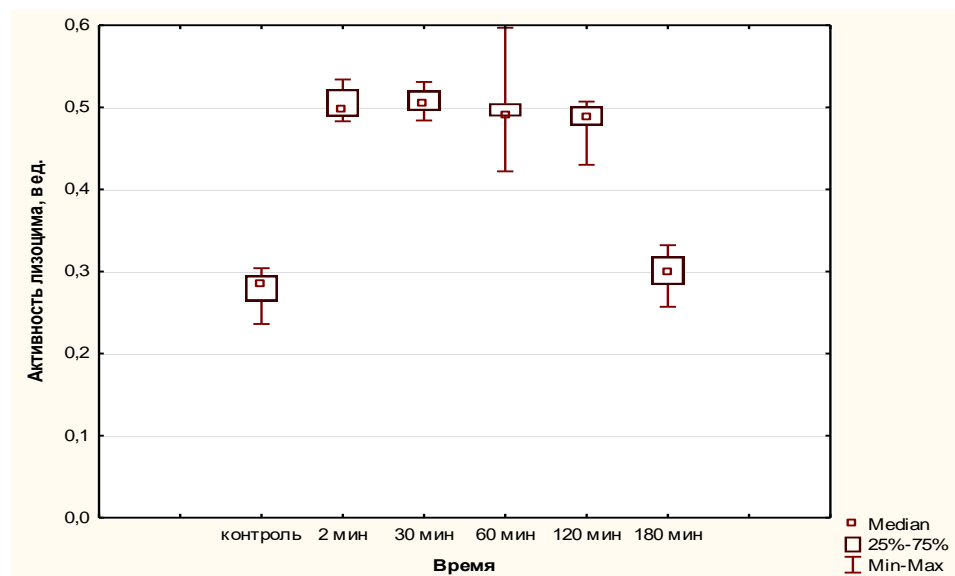


Рис. 3. Динамика изменения активности лизоцима при острой нейропатической боли

Статистический анализ выявил высокозначимое отличие значений, характеризующих активность лизоцима через 2 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин, от контрольных значений.

Казалось бы, изменения активности лизоцима должны иметь одинаковую конфигурацию независимо от вида боли, поскольку уровень ее интенсивности в каждой серии экспериментов достигал 3–4 баллов по избранной шкале.

Сопоставление результатов свидетельствует о том, что следствием каждого вида боли является неодинаковый характер изменения активности лизоцима.

При соматической боли возникает стремительное и непродолжительное повышение активности исследуемого субстрата, уже через 30 мин отмечается выраженная тенденция падения активности ниже контрольных значений. В последующие 2 ч понижение активности принимает стойкий характер и сохраняется на низких цифрах до конца эксперимента.

При формировании висцеральной боли реакция носит инертный характер. Через 2 мин активность лизоцима не меняется, через 30 мин повышается, однако по своим значениям это увеличение ниже, чем при соматической боли. Через 1 ч уровень активности фермента приближается к исходному, а в последующие 2 ч не имеет существенных отличий от контрольных значений.

Острая нейропатическая боль характеризуется стремительным, выраженным и стойким повышением активности исследуемого субстрата, которая сохраняется в течение 2 ч и далее по завершении 3-го ч возвращается к исходным значениям.

Острая соматическая боль вызывает активацию симпатoadреналового звена управления [7]. По данным Ю.И. Шилова, катехоламины, раздражая α -адренорецепторы нейтрофилов, изначально мобилизуют их функциональную активность [2]. Надо полагать, что следствием этого являются усиленная выработка и сброс ими лизоцима. Повышение концентрации катехоламинов в динамике эксперимента достигает порога чувствительности β -адренорецепторов, последние тормозят активность нейтрофилов [8]. Дальнейшая наработка субстрата становится ограниченной, а так как лизоцим быстро разрушается в крови ферментами, его уровень падает ниже контрольных цифр.

Сложнее объяснить динамику изменения активности лизоцима при висцеральной боли. Ранее нами было показано, что после острого болевого эксцесса уровень нейтрофилов резко падает. Очевидно, это связано с маргинальным смещением форменных элементов к стенке сосудов, их фиксацией и готовностью к выходу за ее пределы [9]. Однако висцеральная боль сопровождается вагусными эффектами по определению.

Считается установленным, что на нейтрофилах имеются Н-холинорецепторы. В пользу этого говорят следующие факты: ссылаясь на труды Fujii T. с соавт. (2017) [10] и M.J. Mulcahy с соавт. (2017) [11], свидетельствующие о наличии холинорецепторов, коллектив исследователей показал, что воздействием на нейтрофилы агонистами и антогонистами ацетилхолина достигается изменение их функциональной активности [12]. По данным этих авторов, в процесс вовлекаются $\alpha 7$ -, $\alpha 3\beta 2$ - или $\alpha 6$ -холинорецепторы.

Показано также, что стимуляция Н-холинорецепторов клеток фагоцитарно-моноцитарной системы приводит к редукции их функции [13].

Раздражение холинорецепторов нейтрофилов и, видимо, других лейкоцитов – продуцентов лизоцима медиаторами парасимпатической нервной системы вызывает торможение их функции. Очевидно, этот фактор не позволяет развернуться реакции так масштабно, как при соматической боли: реакция запаздывает и менее выражена, следует думать, что полностью депрессия продукции лизоцима не наступает, а сохраняется ее базальный уровень.

Резкое повышение активности лизоцима и стойкий характер этой реакции при нейропатической боли могут быть связаны с непосредственным раздражением нерва и направлением движения боли непосредственно в структуры мозга, запуском симпатoadреналового звена управления и, как следствие, мобилизацией биосинтеза лизоцима.

В завершение стоит отметить, что понимание различий механизмов активации факторов врожденного иммунитета, в частности лизоцима, предполагает более персонализированный подход к медикаментозному лечению боли различного генеза. Также не стоит забывать про существенную роль лизоцима в контексте дифференциальной

диагностики боли: подразумевается, что он может выступать в роли маркера наличия сильной боли в организме, к тому же сочетание с повышенной его концентрацией с определением различных типов рецепторов нейтрофилов в равной мере подразумевает индивидуальный подход к дальнейшему лечению пациентов с разными видами боли.

Выводы

1. Острая боль независимо от ее природы вызывает повышение активности лизоцима в периферической крови.
2. Соматическая боль сопровождается резкой и быстро истощаемой реакцией активации лизоцима за счет раздражения α -адренорецепторов нейтрофилов.
3. Висцеральная боль сопровождается инертным типом реакции повышения активности лизоцима, основополагающей в данных реакциях можно считать роль H-холинорецепторов нейтрофилов за счет торможения их функции медиаторами парасимпатической системы.
4. Нейропатическая боль сопровождается выраженной и стойкой реакцией повышения активности лизоцима благодаря активации симпатoadреналовой системы.
5. На основе изучения различий механизмов активации боли можно рассматривать более персонализированный подход в диагностике и лечении боли различного генеза.

Список литературы

1. Базарин К.П., Савченко А.А., Александрова Л.И. Изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови у квалифицированных спортсменов // Бюл. Вспц со РАМН. 2013. № 6. С. 16-18.
2. Огнева О.И., Гизингер О.А., Осиков М.В., Матвеев М.О. Сравнительная оценка действия искусственного освещения на эколого – иммунологические показатели в эксперименте // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2014. № 6-1. С. 86-89.
3. Шилов Д.Ю., Черешнев В.А. Влияние агонистов адренорецепторов *in vitro* на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови крыс при остром стрессе и блокаде β -адренорецепторов // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. № 2-1 (35). С. 77-78.
4. Липатова А.С., Каде А.Х., Трофименок А.И., Поляков П.П. Коррекция стресс-индуцированных нейроиммуноэндокринных нарушений у самцов крыс с низкой устойчивостью к стрессу применение транскраниальной электростимуляции // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. 2018. № 3. С. 58-68.

5. Овсянников В.Г. Очерки патофизиологии боли. Ростов н/Д.: Цветная печать, 2003. 159 с.
6. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом // Лабораторное дело. 1968. № 1. С. 28-30.
7. Каплиев А.В. Особенности адренергической реакции в раннем онтогенезе при острой соматической боли: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2007. 22 с.
8. Качина И.И., Шилов Д.Ю., Шилов Ю.И. Влияние агониста бета-адренорецепторов гексопреналина сульфата *in vitro* на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови здоровых людей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012. № 1. С. 72-73.
9. Алексеева Н.С. Механизмы изменения фагоцитарной активности лейкоцитов при острой висцеральной боли: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2009. 21 с.
10. Fujii T., Mashimo M., Moriwaki Y., Misawa H., Ono S., Horiguchi K., Kawashima K. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 1085.
11. Mulcahy M.J., Lester H.A. Granulocytes as models for human protein marker identification following nicotine exposure. *J. Neurochemical.* 2017. Vol. 142 (S2). P. 151-161.
12. Тихонова И.В., Вульфийус Е.А., Жирова Э.А., Серов Д.А., Асташев М.Е., Кашеров И.Е., Сафронова В.Г., Цетлин В.И. Роль никотиновых холинорецепторов в регуляции генерации активных форм кислорода нейтрофилами костного мозга мыши // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино. 2019. С. 186-190.
13. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Шехтер М.С., Кузьмин А.В. Роль м- и н-холинорецепторов в реализации холинергического противовоспалительного механизма в ранней фазе сепсиса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 153. № 5. С. 656-659.