

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ АУТОАНТИТЕЛ К НЕЙРОРЕЦЕПТОРАМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ НЕЙРОЛЕПТИКА ГАЛОПЕРИДОЛА

Батурина М.В.^{1,2}, Грудина Е.В.², Вартанян А.А.^{1,2}

¹Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, e-mail: nimdark@mail.ru;

²ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии, Ставрополь

Опыты были выполнены на 36 белых лабораторных крысах самцах линии Wistar с массой тела 250–280 г. Животным внутривентриально ежедневно в течение 28 суток вводили галоперидол в дозе 0,1 мг/кг и в качестве контроля – физиологический раствор. У животных, получавших галоперидол, было обнаружено накопление по сравнению с контрольными животными аутоантител в сыворотке крови и в ткани головного мозга к нейрорецепторам: NMDA (субъединицы NR1, NR2A, NR2B) и к дофаминовым рецепторам первого и второго типов (DR1 и DR2). При этом содержание аутоантител в головном мозге было существенно ниже. Высокие уровни аутоантител были выявлены через 2 и 4 недели от начала иммунизации животных. После завершения хронического введения галоперидола высокий уровень аутоантител сохранялся через 3 и 7 суток после последнего введения препарата. Через 14 дней после завершения инъекций содержание аутоантител в крови и головном мозге существенно снизилось. Было обнаружено увеличение аутоантител в сыворотке к белку S100B. Уровни аутоантител к белку S100B в сыворотке крови имели положительную сильную связь с содержанием в ткани мозга аутоантител к NR2B, к DR1 и DR2. Следовательно, в ответ на введение галоперидола развивается аутоиммунный ответ с накоплением аутоантител к NMDA и дофаминовым рецепторам не только в крови, но и в ткани головного мозга, что, вероятно, может модифицировать психотропные эффекты и реализовывать побочное действие нейролептика.

Ключевые слова: галоперидол, крысы, аутоантитела, NMDA рецепторы, дофаминовые рецепторы.

CHANGES IN THE AUTOANTIBODIES LEVELS TO NEURORECEPTORS IN THE BLOOD SERUM AND BRAIN TISSUE OF RATS DURING CHRONIC ADMINISTRATION OF BROMOCRIPTINE

Baturina M.V.^{1,2}, Grudina E.V.², Vartanian A.A.^{1,2}

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, e-mail: nimdark@mail.ru;

²The Center of Clinical Pharmacology and Pharmacotherapy LLC, Stavropol

The experiments were performed on 36 white male laboratory Wistar rats with a body weight of 250–280 g. The animals were administered intraperitoneal haloperidol daily for 28 days at a dose of 0.1 mg / kg and, as a control, saline solution. Animals receiving haloperidol has shown the accumulation of autoantibodies in blood serum and brain tissue to neuroreceptors (NMDA subunits NR1, NR2A, NR2B) and to dopamine receptors of the first and second types (DR1 and DR2) compared with control. At the same time, the level of autoantibodies in the brain was significantly lower. High levels of autoantibodies were detected at 2 and 4 weeks after the start of animal immunization. After the completion of chronic administration of haloperidol, a high level of autoantibodies persisted for 3 and 7 days after the last administration of the drug. 14 days after the completion of injections, the level of autoantibodies in the blood and brain decreased significantly. Serum autoantibodies to the S100B increasing were found. The levels of autoantibodies to the S100B protein in the blood serum had a positive strong association with the level of autoantibodies to NR2B, DR1 and DR2 in brain tissue. Consequently, in response to the haloperidol administration, an autoimmune response develops with the accumulation of autoantibodies to NMDA and dopamine receptors not only in the blood, but also in the brain tissue, which can probably modify the psychotropic effects and realize the neuroleptics' side effects.

Keywords: haloperidol, rats, autoantibodies, NMDA receptors, dopamine receptors.

Ранее нами было установлено, что при хроническом введении нейролептических средств у экспериментальных животных в сыворотке крови обнаруживается повышенный уровень аутоантител (ААТ) к дофаминовым и к NMDA рецепторам [1]. При длительном введении агонистов дофаминовых рецепторов также наблюдается повышение содержания

ААТ к этим же рецепторам [2]. Интересно, что были установлены корреляционные связи между уровнями ААТ и выраженностью каталептогенного действия галоперидола [3]. Эти данные позволили предположить, что ААТ к нейрорецепторам, с которыми взаимодействуют нейро- и психотропные препараты, вероятно, принимают участие в реализации их специфической активности [3].

Способность циркулирующих в крови ААТ проникать через ГЭБ и оказывать воздействие на рецепторы мозга обсуждается. Предполагается возможность интратекального образования антител [4, 5]. Сравнительно недавно появилось несколько методически качественно выполненных работ, в которых приводятся данные, подтверждающие, что антитела IgG способны диффундировать в ткань мозга у животных без повреждения гематоэнцефалического барьера [6, 7]. В связи с этим представлялось интересным решить две задачи: выяснить способность ААТ к нейрорецепторам проникать в ткани головного мозга у животных, а также изучить динамику уровней ААТ в сыворотке крови и в тканях головного мозга в различные сроки хронического введения галоперидола – классического антипсихотического средства.

Цель исследования – изучить изменение уровней ААТ к нейрорецепторам в сыворотке крови и ткани переднего мозга у крыс при хроническом введении галоперидола.

Материалы и методы исследования

Опыты были выполнены на 36 белых лабораторных крысах самцах линии Wistar с массой тела 250–280 г, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

Были сформированы 7 групп животных. Крысам контрольной группы (первая группа – 6 крыс) внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Остальные животные получали внутрибрюшинно галоперидол в дозе 0,1 мг/кг: вторая группа (5 крыс) в течение 2 недель ежедневно, третья (5 крыс), четвертая (5 крыс), пятая (5 крыс), шестая (5 крыс) и седьмая (5 крыс) группы в течение 4 недель ежедневно.

После завершения инъекций у крыс забирали кровь по следующей схеме: первая группа (контрольная) – через 3 дня после последней инъекции физиологического раствора; вторая группа – на следующие сутки после завершения введения галоперидола в течение 2 недель; третья группа – на следующие сутки после завершения введения галоперидола в течение 4 недель; четвертая группа – через 3 суток после последней инъекции в течение 4 недель; пятая группа – через 7 суток; шестая группа – через 14 суток, седьмая – через 4 недели после последней инъекции галоперидола.

Кровь забирали в пробирки, отстаивали в течение 30 минут при температуре +37°C, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Полученные образцы сыворотки

хранились в морозильной камере при температуре -40°C . Крыс декапитировали и извлекали головной мозг, который отмывали от крови холодным физиологическим раствором в течение 40–50 сек, очищали от паутинной оболочки, обсушивали на фильтровальной бумаге и замораживали. Материал до проведения иммунологического тестирования хранился в морозильной камере при температуре -40°C . Перед исследованием на наличие ААТ передний мозг взвешивали, измельчали и гомогенизировали механически, добавляли охлажденный фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,4) в соотношении «ткань : буфер – 1:3), перемешивали, осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочная жидкость использовалась для проведения иммуноферментного анализа (ИФА).

Количественное определение уровней ААТ в сыворотке крови и супернатанте гомогената головного мозга проводили с помощью ИФА. Оценивали концентрацию ААТ (IgG) в сыворотке крови и мозговой ткани к дофаминовым рецепторам 1-го и 2-го типов (DR1 и DR2), а также к NR1, NR2A, NR2B субъединицам NMDA рецептора. Содержание ААТ к белку S100B оценивали в сыворотке крови. Кроме того, определяли уровень специфических антител (АТ) IgG к галоперидолу. На твердой фазе полистироловых планшетов был иммобилизован антиген соответствующего рецептора или белка S100B (Cloud-Clone Corp. – США/КНР) либо галоперидола. Применялись тест-системы, разработанные ООО НПО «Иммунотэкс» (Россия). Исследование проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Лазурит» (Dy nex Technologies, США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ полученных результатов измерений выполняли с применением прикладных программ STATISTICA (StatSoft Inc., США). Учитывая, что по данным критерия Шапиро–Уилка распределения не соответствовали нормальному, применяли методы непараметрической статистики.

Исследование выполнялось в соответствии с положениями Женевской конвенции 1985 года о международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных и Хельсинкской декларацией 2000 года о гуманном отношении к животным, а также приказа МЗ РФ № 199н «Об утверждении правил лабораторной практики» от 1 апреля 2016 г.

Результаты исследования и их обсуждение

У крыс контрольной группы содержание ААТ в сыворотке крови колебалось (min-max) в пределах 0,8–10,9 Ед/мл, а в ткани мозга – 0,4–1,8 Ед/мл. Длительное ежедневное введение галоперидола вызывало выраженное нарастание уровня ААТ к нейрорецепторам и в сыворотке крови (табл. 1), и в ткани головного мозга. При этом уровни ААТ в ткани мозга были значительно ниже (табл. 2), чем в сыворотке, но достоверно выше, чем в мозге у контрольной группы крыс ($p < 0,01$).

Анализ изменений ААТ в сыворотке крови показывает, что их уровень нарастал к концу инъекционной процедуры (4 недели введения), и начинал снижаться через 7 суток, и особенно через 14 суток после последней инъекции нейролептика. Следует обратить внимание на то, что уровень ААТ к дофаминовым рецепторам начинал снижаться уже через 3 суток после последнего введения препарата. При этом содержание ААТ к NMDA рецепторам (NR1 и NR2A) в эти сроки еще оставалось высоким. Через 4 недели после прекращения введения галоперидола уровень ААТ в сыворотке крови заметно снижался и был сопоставим со значениями в контрольной группе животных.

Изменение содержания в сыворотке крови ААТ к белку S100B происходило аналогичным образом: было наибольшим в конце курса инъекций (сразу по завершении введения галоперидола в течение 4 недель), а также через 3 суток после окончания иммунизации. Затем происходило постепенное снижение уровня ААТ (табл. 1).

Таблица 1

Изменение уровней аутоантител (Ед/мл) к нейрорецепторам и белку S100B в сыворотке крови у крыс [Ме (Q1-3)]

ААТ к мозговым антигенам	2 недели введения	4 недели введения	Через 3 суток после последней инъекции	Через 7 суток после последней инъекции	Через 14 суток после последней инъекции
DR1	122,6 (95,3–177,8)	205,7 (157,8–212,9)	188,4 (109,9–208,1)	118,0 (116,9–134,3)	70,7 (63,8–82,8)
DR2	83,7 (68,1–119,8)	141,4 (117,0–169,3)	104,6 (94,8–110,9)	98,8 (89,5–106,1)	39,9 (35,8–40,3)
NR1	87,5 (75,1–171,6)	160,4 (120,6–233,4)	161,8 (155,3–171,3)	75,9 (75,3–162,5)	48,2 (34,0–62,3)
NR2A	135,7 (98,7–179,1)	296,6 (272,9–307,7)	270,0 (265,7–298,1)	201,9 (191,8–209,9)	92,0 (82,6–98,2)
NR2B	71,7 (69,3–72,4)	102,6 (100,8–104,6)	90,7 (80,8–92,7)	69,5 (68,1–74,5)	41,2 (38,3–43,8)
Белок S100B	83,2 (65,5–100,0)	107,8 (101,4–173,6)	110,5 (90,6–114,0)	76,0 (56,9–85,5)	33,4 (29,7–37,6)

В ткани переднего мозга крыс, длительно получавших галоперидол, также обнаруживались высокие по сравнению с контрольной группой крыс уровни ААТ и к дофаминовым, и к NMDA рецепторам. Максимальное накопление ААТ в мозговой ткани прослеживалось через 4 недели регулярного введения нейролептика, а также через 3 суток

после последнего введения препарата. Интересно, что содержание ААТ к NR1 продолжало увеличиваться к этому сроку, хотя уровни ААТ к другим рецепторам практически не менялись с момента прекращения инъекций. При оценке концентрации ААТ в переднем мозге крыс через 7 суток после последнего введения галоперидола обнаружено, что их содержание заметно снижалось. Через 14 суток в ткани мозга уровни ААТ были уже близки к контрольным значениям. Впрочем, в эти сроки количество ААТ было достоверно выше, чем у контрольных крыс к NR2B ($p=0,006$), к DR1 ($p=0,045$) и к DR2 ($p=0,018$). Через 4 недели после завершения инъекций различий между опытными и контрольными крысами по содержанию ААТ в ткани мозга не выявлялось.

Таблица 2

Изменение уровней аутоантител (Ед/мл) к нейрорецепторам в ткани головного мозга крыс [Ме (Q1-3)]

ААТ мозговым антигенам	2 недели введения	4 недели введения	Через 3 суток после последней инъекции	Через 7 суток после последней инъекции	Через 14 суток после последней инъекции
DR1	16,5 (12,5–24,8)	34,0 (21,8–35,1)	33,8 (28,8–35,4)	18,1 (15,8–31,4)	1,5 (1,4–1,6)
DR2	10,9 (7,6–15,7)	22,6 (15,8–24,6)	21,2 (14,7–23,0)	8,4 (7,1–9,3)	1,77 (1,5–1,84)
NR1	11,9 (10,2–25,5)	16,4 (10,3–42,9)	21,7 (18,1–25,7)	10,2 (9,8–10,3)	1,9 (1,3–2,0)
NR2A	12,5 (11,8–14,5)	23,5 (18,1–25,1)	22,9 (17,4–24,5)	14,5 (13,2–21,5)	2,1 (1,5–2,2)
NR2B	8,4 (6,9–13,7)	13,9 (12,8–14,3)	11,9 (10,4–15,4)	11,1 (8,9–11,3)	1,6 (1,5–1,8)

Сравнение уровней ААТ в сыворотке и в ткани головного мозга (табл. 1 и табл. 2) показывает, что наиболее высокими в крови были уровни ААТ к DR1 и к NR2A. В ткани головного мозга также наиболее высокими были уровни ААТ к DR1 и к NR2A. Напротив, уровни ААТ к DR2 и NR2B были меньшими в крови и в головном мозге. Следовательно, просматривается определенный параллелизм в содержании ААТ в крови и ткани переднего мозга у крыс.

В связи с этим представлялось интересным провести корреляционный анализ (по Спирмену) для выявления связи содержания ААТ в сыворотке крови и ткани мозга. Действительно, оказалось, что содержание ААТ к конкретным нейрорецепторам в обоих изученных объектах было сильно связано. Коэффициенты корреляции соответственно составляли для NR1 $r=0,8$; NR2A $r=0,74$; NR2B $r=0,8$; DR1 $r=0,84$; DR2 $r=0,82$. Следовательно, высокое содержание ААТ в сыворотке крови совпадает с высоким уровнем этих же ААТ в

ткани мозга. Эти данные хорошо согласуются с наблюдениями некоторых авторов, которые показали, что антитела IgG способны проникать через ГЭБ либо синтезироваться иммунной системой мозга [4, 5, 6].

Сывороточный уровень ААТ к белку S100B был сильно связан с содержанием ААТ к NR2B ($r=0,849$; $p<0,05$), DR1 ($r=0,74$; $p<0,05$), DR2 ($r=0,72$; $p<0,05$). Связь расценивалась как заметная с уровнями ААТ к NR1 ($r=0,58$; $p<0,05$) и NR2A ($r=0,69$; $p<0,05$). Следует отметить, что сывороточный уровень ААТ к белку S100B был сильно связан с содержанием в ткани мозга ААТ к NR1 ($r=0,70$; $p<0,05$), NR2A ($r=0,82$; $p<0,05$), NR2B ($r=0,80$; $p<0,05$). Отмечалась также сильная связь с ААТ в мозге к DR1 ($r=0,74$; $p<0,05$) и заметная с ААТ к DR2 ($r=0,61$; $p<0,05$).

В ходе исследования было обнаружено, что в сыворотке крови и ткани переднего мозга определялись специфические IgG к нейролептику – галоперидолу (табл. 3). У контрольных животных эти АТ не были обнаружены. Можно видеть, что соотношение количества АТ к галоперидолу в крови и мозге было аналогичным для ААТ к нейрорецепторам.

Таблица 3

Изменение содержания антител (IgG) к галоперидолу (Ед/мл) в сыворотке крови и в ткани мозга [Ме (Q1-3)]

АТ к галоперидолу	2 недели введения	4 недели введения	Через 3 суток после последней инъекции	Через 7 суток после последней инъекции	Через 14 суток после последней инъекции
В сыворотке крови	102,9 (90,6–125,2)	111,7 (101,1–181,1)	96,3 (84,4–107,2)	74,2 (71,3–87,5)	10,8 (10,3–11,7)
В ткани мозга	13,8 (12,1–16,1)	11,4 (11,1–11,8)	11,2 (9,5–12,8)	9,7 (9,3–10,0)	8,1 (7,0–8,5)

После прекращения инъекций препарата содержание АТ к галоперидолу снижалось. При этом в ткани мозга уровень АТ уменьшался медленнее. Через 14 суток после последней инъекции галоперидола содержание АТ к нему в сыворотке крови и в ткани мозга было сопоставимо. При корреляционном анализе установлено наличие заметной связи уровней АТ в крови и ткани мозга ($r=0,56$; $p<0,05$). Следует отметить, что связи между уровнями ААТ к нейрорецепторам в крови и мозге были заметно сильнее.

Таким образом, выполненное исследование подтвердило ранее полученные данные о способности галоперидола повышать уровень ААТ (IgG) к дофаминовым (DR1 DR2) и к NMDA рецепторам [1]. При этом было установлено, что содержание ААТ в сыворотке крови у иммунизированных животных остается высоким (по сравнению с контролем) через 7 и 14 суток после последней инъекции галоперидола. Важно, что хроническое применение

галоперидола вызывало повышение количества ААТ и в ткани головного мозга животных. При этом достаточно высокое содержание ААТ сохранялось в течение 7 суток после последней инъекции препарата. Обнаруженная способность ААТ (IgG) накапливаться в ткани мозга совпадает с наблюдениями других авторов [6]. Это позволяет предположить, что ААТ к нейрорецепторам могут оказывать специфическое воздействие на функцию конкретных рецепторов. Возможно, что после отмены препаратов ААТ какое-то время тоже оказывают свое действие.

Считают, что белок S100B, как и ААТ к нему, является важным маркером эксайтотоксичности [8, 9, 10]. В связи с этим можно предположить, что накопление ААТ к NMDA рецепторам в ткани головного мозга запускает процесс эксайтотоксичности с последующим освобождением белка S100B и накоплением ААТ к нему в сыворотке крови.

Заключение

Таким образом, длительное введение галоперидола крысам вызывает нарастание уровней ААТ к NMDA и дофаминовым рецепторам в сыворотке крови и в ткани головного мозга. При этом уровни ААТ в крови и ткани мозга были тесно связаны. После прекращения введения препарата содержание ААТ в сыворотке крови снижалось, но оставалось через 14 дней после последней инъекции заметно выше, чем у контрольных животных. В ткани мозга содержание ААТ также параллельно снижалось после прекращения введений галоперидола. Следовательно, в ответ на введение галоперидола развивается аутоиммунный ответ с накоплением аутоантител к NMDA и дофаминовым рецепторам не только в крови, но и в ткани головного мозга, что, вероятно, может модифицировать психотропные эффекты и реализовывать побочное действие нейролептика.

Список литературы

1. Батурина М.В., Бейер Э.В., Батурин В.А. Влияние хронического введения галоперидола и рисперидона на уровень аутоантител к дофамину и дофаминовым рецепторам у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021. Т. 84. № 7. С. 3-5. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-7-3-5.
2. Baturina M.V., Beyer E.V., Zhurbin S.A., Dergunova M.A., Baturin V.A., Grudina E.V. Influence of chronic administration of antiparkinson drugs on levels of serum autoantibodies to dopamine and NMDA receptors // Medical News of North Caucasus. 2022. Vol. 17. no. 2. P. 178-182. DOI: 10.14300/mnnc.2022.17043.

3. Baturina M.V., Beier E.V., Boev O.I., Popov A.V. Changes in the severity of haloperidol catalepsy in rats under chronic administration of neuroleptics // *Medical News of North Caucasus*. 2019. Vol. 14. no. 3. P. 536-537. DOI: 10.14300/mnnc.2019.14132.
4. Цыбиков Н.Н., Цыбикова Е.А. Нейроиммунные взаимоотношения в патогенезе алкогольного делирия // *Забайкальский медицинский вестник*. 2008. № 1. С. 9-21.
5. Pollak T.A., Beck K., Irani S.R., Howes O.D., David A.S., McGuire P.K. Autoantibodies to central nervous system neuronal surface antigens: psychiatric symptoms and psychopharmacological implication // *Psychopharmacology*. 2016. Vol. 233. P. 1605-1621. DOI: 10.1007/s00213-015-4156-у.
6. Glass L., Sinclair D., Boerrigter D. et al. Brain antibodies in the cortex and blood of people with schizophrenia and controls // *Transl. Psychiatry*. 2017. Vol. 7. P. e1192. DOI: 10.1038/tp.2017.134.
7. Маталыгина О.А. Иммунная система мозга, защита и управление // *Medicine: Theory and Practice*. 2020. Т. 5. № 4. С. 21-26.
8. Скрипченко Н.В., Широкова А.С. Нейронспецифическая енолаза и белок S100 – биомаркеры повреждений головного мозга. Состояние вопроса и клиническое применение // *Нейрохирургия и Неврология детского возраста*. 2016. № 4. С. 16-23.
9. Грудень М.А., Шерстнев В.В. Оценка состояния гематоэнцефалического барьера и развитие аутоиммунных реакций к белку S100В в системе предгипертония/гипертония // *Научный форум. Сибирь*. 2018. Т. 4. № 2. С. 89-91.
10. Винарская А.Х., Боговид Т.Х., Андрианов В.В. Кальций-связывающий белок S100В и некоторые проблемы неврологии // *Евразийское научное объединение*. 2020. Т. 62. № 4-3. С. 146-150.