

УДК 612.017.1:612.8.015.3:612.8 — 009.24

## ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВО В НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ: КАТЕХОЛАМИНЫ, ПОВЕДЕНИЕ И СУДОРОЖНАЯ ГОТОВНОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНЪЮГАТОМ АЛЬБУМИНА С СИДНОФЕНОМ

Ашмарин И. П., Данилова Р. А., Мельник Е. И.,  
Обухова М. Ф., Сагимбаева Ш. К., Циренина М. Л.,  
Ганжа С. Ю., Колтовая Н. А.

*МГУ им. М. В. Ломоносова*

*Институт прикладной молекулярной биологии МЗ СССР, Москва*

В статье на основании литературных и собственных экспериментальных данных рассматривается перспективный формирующийся путь «инверсной» регуляции, то есть коррекции биохимического и физиологического статуса организма посредством активной иммунизации к биорегуляторам — как эндогенным, так и экзогенным.

Иммунизация конъюгатами аналога фенилмина сиднофена с БСА позволяет на длительный период изменять как биохимические (содержание катехоламинов), так и физиологические (поведение, алкоголизируемость, судорожная чувствительность) показатели у крыс.

\* \* \*

В последние годы все чаще используется метод иммунологического изменения состояния регуляторных систем организма. Ранее преобладали эксперименты по пассивной иммунизации антителами к тем или иным регуляторам (пептидам, классическим нейромедиаторам и т.п.). Они принесли определенную пользу, хотя очевидный недостаток этого пути состоял в кратковременности эффекта. Активная иммунизация к регуляторным соединениям, осуществляемая, как правило, введением ковалентных конъюгатов регуляторных соединений с антигенами-носителями, ведет к длительным и глубоким эффектам, так как образование антител охватывает периоды времени, измеряемые месяцами (а в ряде случаев особенно при реиммунизации, — годами). В то же время, биохимический и физиологический эффект всегда оказывается более сложным, так как длительное связывание антителами одного регулятора не может не оказывать влияния на состояние других, сопряженных с ним регуляторных систем.

Понятна привлекательность такого пути воздействия на организм и для теоретических исследований, и для практической перспективы: длительный эффект при малом числе воздействий. История исследования активной иммунизации к эндогенным биорегуляторам своеобразна. Для развития методов радиоиммунного и иммуоферментного определения низкомолекулярных веществ уже давно разработаны методы получения

антисывороток к этим гаптенам, основанные на активной иммунизации животных соответствующими конъюгатами. Однако исследователей интересовала при этом, главным образом или исключительно, высокоактивная сыворотка, а глубокие биохимические и физиологические сдвиги в организме донора сыворотки не привлекали внимания.

Отметим исследования, которые можно отнести к числу наиболее эффективных по глубине, длительности и интересности сдвигов при активной иммунизации к биорегуляторам. Прежде всего это большой цикл работ по иммунизации к люлиберину животных разных видов [1]. Он привел к созданию метода иммунологической кастрации, с одной стороны, и к новым способам модуляции активности половых желез при раке, с другой. Параллельно развивавшийся цикл работ по иммунизации к соматостатину [2] привел к формированию метода значительной стимуляции роста ряда животных, в том числе сельскохозяйственных. Опубликованы сообщения о значительных и длительных сдвигах функций при иммунизации к ряду других регуляторов [3—5]: к тиролиберину — снижение уровня йодтиронинов и пролактина, к кортиколиберину — подавление функций и частичная редукция мозгового слоя надпочечников, к брадикинину — моделирование длительной гипертонии, к кортикотропину «4—10» — подавление обучаемости, к  $\beta$ -эндорфину — подавление фобий и индукция «киндлинга», к серотонину — снижение влечения к алкоголю экспериментальных животных. Как правило, общая направленность эффектов иммунизаций к биорегулятору является обратной по отношению к эффектам того же биорегулятора как такового. Иногда, однако, возникают и непредсказуемые эффекты. Например, при иммунизации к  $\beta$ -эндорфину не наблюдалось повышения ноцицепции, хотя именно этот эффект можно было ожидать, исходя из анальгетической активности опиоидов. Не наблюдалось, как правило, гипотензии при иммунизации к ангиотензину II, хотя иммунизация к ренину — одному из генераторов ангиотензина II вела к стойкой глубокой гипотензии [6]. Такие отклонения от общего направления эффектов немногочисленны. Поэтому описываемый путь можно назвать инверсной регуляцией биохимического и физиологического статуса.

Инверсная регуляция может осуществляться не только с помощью эндогенных регуляторов. Многим фармакологическим средствам соответствуют в организме те или иные эндогенные аналоги-регуляторы или их комплексы. Так обстоит дело с эндогенными аналогами опиатов, бензодиазепинов, антидепрессантов, нейролептиков и т.п. Поэтому соединение с антигенами-носителями фармакологических средств и иммунизация такими конъюгатами индуцирует образование антител не только к ним самим, но и к их эндогенным аналогам-регуляторам. В свою очередь это также ведет к длительным изменениям биохимического и физиологического статуса. Целесообразность использования эндогенного биорегулятора или фармакологических агентов экзогенного происхождения определяется особенностями конкретных задач того или иного исследования.

Мы обратились к некоторым антидепрессантам и психостимуляторам, рассчитывая на то, что образующиеся антитела могут связывать их эндогенные аналоги и формировать длительные состояния, сходные с эффектами агентов нейролептического характера. В частности, был избран

сиднофен — психостимулятор и антидепрессант, родственный по структуре фенамину, и как антиген-носитель — БСА.

### Материалы и методы

Конъюгирование сиднофена — 3-( $\beta$ -фенилизопропил)-сиднонемино гидрохлорида (СССР) с БСА велось с помощью глутарового альдегида и позволяло варьировать уровень связывания сиднофена от 5 до 35 моль на 1 моль белка. Предварительный цикл экспериментов показал, что наибольший уровень образования антител к сиднофену и наиболее выраженные физиологические сдвиги наблюдаются при иммунизации белых крыс конъюгатом, содержащим от 18 до 28 моль сиднофена на 1 моль белка, троекратно в дозе около 800 мкг/кг с недельными интервалами, первые два раза — с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). Титры антител в период наибольшего развития физиологических сдвигов — через 2 месяца после первой иммунизации составляли, как правило, 1/256 — 1/2048.

Известно действие сиднофена (как и других соединений сидноимного ряда) на катехоламинергическую передачу. Если ориентироваться на изложенную выше концепцию, то представляется вероятным, что гипотетические эндогенные аналоги сиднофена, которые могут связываться антителами к сиднофену, так или иначе сопряжены с системой катехоламинов. Поэтому мы в первую очередь определили уровень катехоламинов в плазме крови и в головном мозгу иммунизированных крыс. Головной мозг (без стволовой части) непосредственно после декапитации беспородных крыс-самцов массой 180—200 г гомогенизировали с 1,5 мл 0,1 н.  $\text{HClO}_4$ , центрифугировали (3 мин, 8000 g). 200 мкл супернатанта использовали для определения норадреналина, дофамина и серотонина с помощью ВЭЖХ; колонка Lichrosorb RP—18, элюент — 0,5 М фосфатный буфер (рН 3,8) с добавкой 80 мг/л гексансульфоната натрия в 4%-ном метаноле. Детектирование осуществляли с помощью спектрофлуорометра («Hitachi», Япония), модель 650—60, с проточной кюветой объемом 10 мкл;  $\lambda$  возбуждения — 280 нм,  $\lambda$  эмиссии — 320 нм.

Кровь (0,5—1,0 мл), отобранную при декапитации животного, после добавления гепарина обрабатывали по методу Mogi [7]. Для определения серотонина супернатант после отделения окиси алюминия обрабатывали 75 мкл 60%-ной хлорной кислоты, осадок отделяли, раствор обрабатывали 10%-ным  $\text{NaOH}$  до рН 3,5. 100 мкл полученного раствора использовали для анализа методом ВЭЖХ в условиях, указанных выше.

### Результаты и обсуждение

Весь комплекс данных, представленных на рис. 1, свидетельствует о существенно меньшем уровне норадреналина в крови иммунизированных к сиднофену крыс на 32—47-й день по сравнению с контрольными. Особо на рисунках выделена часть данных, полученных на группах крыс, в которых уровень норадреналина в крови контрольных животных превышал 4,5 нг/мл плазмы. В этом случае различия выражены еще резче. Менее выраженным является сравнительный дефицит дофамина в мозгу.

Динамика процесса, как правило, состояла в некотором начальном повышении уровня норадреналина и адреналина в крови и мозгу на 12—25 дни. Далее следовало значительное снижение концентрации норадреналина и менее значительное снижение концентрации адреналина в крови на 32—47 дни. Концентрация дофамина снижалась, уже начиная с 12-го дня, но существенное снижение наблюдалось к 32—47 дню.

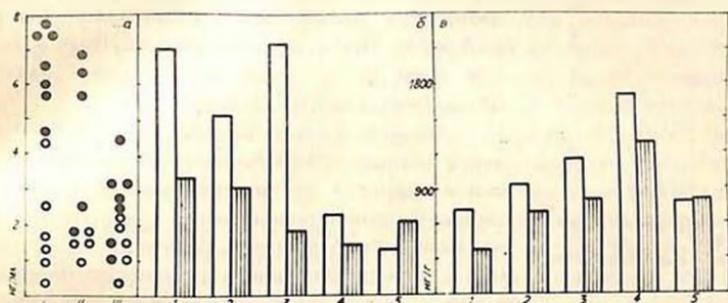


Рис.1. Содержание норадреналина в плазме крови и дофамина в мозгу контрольных и иммунизированных конъюгатом сиднофена с БСА крыс (на 32—47-й день после первой иммунизации). а — уровень норадреналина (нг/мл плазмы) у контрольных (I), иммунизированных БСА (II) и иммунизированных конъюгатом (III) животных; б — средние значения уровня норадреналина в разных сериях опытов. □ — контрольные животные, ■ — иммунизированные конъюгатом животные. 1 — 5 — серии опытов. а — средние значения уровня дофамина (нг/г ткани) в мозгу контрольных и иммунизированных конъюгатом животных

Наибольшие сдвиги в поведении крыс также отмечены на 30—50-е сутки после иммунизации. Лишь в части опытов существенные сдвиги наблюдались уже на 20-е сутки. Главные изменения выявляются в тестах с использованием пищедобывательной лабиринтной методики. Детально они изложены ранее [8, 9]. У большинства иммунизированных конъюгатом животных при помещении их в экспериментальную обстановку отмечается сниженный уровень ориентировочно-исследовательской активности, неподвижность, оцепенение. Характерны настораживание, пугливость, боязнь взять подкрепление из кормушки; двигательная активность чаще проявляется импульсами. Все это сопровождается и отдельными признаками вегетативного возбуждения (частая дефекация, уринаяция). В общем наблюдается пассивное поведение с отдельными проявлениями тревоги. Образование пищедобывательного навыка у этих животных оказывается сильно затрудненным, а иногда вообще невозможным. С 1-го по 4-й день обучения таких крыс сохраняется низкий уровень выполнения, без положительной динамики как по числу реакций, так и по времени их выполнения; доля крыс с низкими показателями обучения, в том числе и крыс, которые не выполняют за все опытные дни ни одной подкрепляемой реакции, значимо больше, чем в контрольных группах ( $p \leq 0,01$ ; вводили либо БСА, обработанный глутаровым альдегидом, с ПАФ, либо сиднофен, либо физиологический раствор).

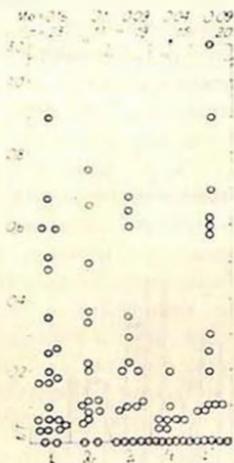


Рис.2. Временные показатели наступления коразолового судорожного припадка при введении физиологического раствора (1), сиднофена (2), после иммунизации БСА (3) и после иммунизации конъюгатом сиднофена с БСА (4,5): тестирование через 35—40 дней после первой иммунизации (4) и через 60 и более дней (5). По оси абсцисс — номера групп, по оси ординат — величина, обратная латентному периоду судорожного припадка в минутах. Me — медиана, n — число животных, звездочкой отмечены статистически значимые различия по сравнению с группами 1, 2, 5 ( $p < 0,01$ ) и группой 3 ( $p < 0,05$ )

у иммунизированных к сиднофену крыс, а также данные литературы о способности сиднофена как такового стимулировать потребление алкоголя, побудили нас оценить в той же схеме эксперимента влияние конъюгата сиднофена на возможность «алкоголизации» крыс. Эти данные опубликованы ранее [9] и с высоким уровнем достоверности свидетельствуют о возможности таким путем подавить процесс «алкоголизации» животных. Возможная роль в механизмах этого процесса изменений уровня катехоламинов следует не только из представленных выше данных, но и из публикаций [4, 5], где подавление алкогольной мотивации достигалось

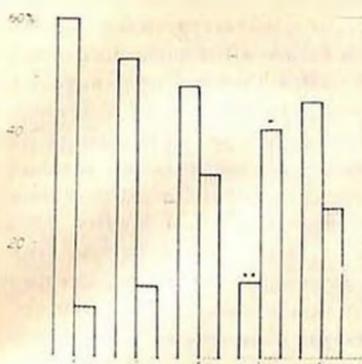
Вызванные конъюгатом изменения начинают проявляться через неделю после окончания иммунизации, максимально развиваются через 2—4 недели и сохраняются до 1,5—2 месяцев. О подавлении ориентировочно-исследовательской активности у иммунизированных крыс свидетельствует и снижение показателей в норковом тесте и при помещении крыс в трехлучевой лабиринт с регистрацией числа заходов в каждый рукав. При тестировании животных в открытом поле до и после иммунизации различий между группами не обнаружено.

По результатам выработки условного рефлекса активного избегания существенных различий в скорости достижения критерия обучения между иммунизированными и контрольными животными не наблюдается. Отмечена лишь тенденция к улучшению условнорефлекторных показателей у крыс, которым вводили сиднофен, и ухудшение у крыс, иммунизированных БСА, причем различие между этими группами достоверно ( $p \leq 0,05$ ). Однако у крыс, иммунизированных конъюгатом, достоверно увеличивается латентный период условнорефлекторной реакции избегания тока (на свет).

Что касается изменений в контрольных сериях, то необходимо отметить некоторое, хотя и сравнительно небольшое, снижение условнорефлекторных показателей при выработке пищедобывательного навыка в группе, иммунизированной БСА с ПАФ. Однако это наблюдается только в первый день обучения, и все описанные выше признаки поведения, характерные для опытных крыс, животным данной группы не присущи. Введение конъюгата сиднофена с БСА приводит к гораздо более глубоким и качественно отличающимся изменениям.

Глубина и длительность выявленных изменений образования пищедобывательного навыка

сиднофену крыс, а также данные литературы о способности сиднофена как такового стимулировать потребление алкоголя, побудили нас оценить в той же схеме эксперимента влияние конъюгата сиднофена на возможность «алкоголизации» крыс. Эти данные опубликованы ранее [9] и с высоким уровнем достоверности свидетельствуют о возможности таким путем подавить процесс «алкоголизации» животных. Возможная роль в механизмах этого процесса изменений уровня катехоламинов следует не только из представленных выше данных, но и из публикаций [4, 5], где подавление алкогольной мотивации достигалось



**Рис.3.** Распределение животных в разных группах по латентному период наступления коразолового судорожного припадка: □ — меньше 10 мин, □ — отсутствие судорожного припадка в течение 30 мин. По оси абсцисс — номера групп, по оси ординат — число животных в %. Группы крыс: 1 — с введением физиологического раствора; 2 — с введением сиднофена 3 — иммунизированные БСА; 4 — иммунизированные конъюгатом сиднофена с БСА; тестирование через 35—40 дней после первой иммунизации; 5 — то же, но тестирование через 60 и более дней после первой иммунизации. Статистически значимые различия: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

активной иммунизацией к серотонину и адреналину.

Наконец, глубина, направленность и длительность отмеченных изменений поведения животных побудили нас оценить влияние иммунизации на порог судорожной чувствительности. Для создания коразоловой модели судорог через 35—40 и более 60 дней после иммунизации, а также контрольным группам крыс вводили коразол (60 мг/кг, подкожно). Регистрировали латентный период от момента введения коразола до начала пятой стадии миоклонического припадка. Анализ полученных данных показывает, что в группе иммунизированных конъюгатом сиднофена с БСА крыс при тестировании на 35—40-й день в целом наблюдается самый большой латентный период наступления судорожного припадка по сравнению с контрольными и другими опытными группами (рис. 2). В этой группе более чем в 4 раза уменьшается число крыс с высокой чувствительностью к коразолу (с латентным периодом наступления припадка  $< 10$  мин)

и более чем в 4 раза увеличивается число крыс, у которых в течение 30-минутного периода вообще не наблюдается припадка (рис. 3). В группах крыс, иммунизированных как БСА, так и конъюгатом, но тестированных через 60 и более дней после начала иммунизации, отмечена тенденция к увеличению числа крыс, не дающих припадок. По латентному периоду наступления припадка изменений по сравнению с контролем в этих группах не отмечается.

Таким образом, иммунизация конъюгатами сиднофена с БСА позволяет получить длительное изменение состояния белых крыс по биохимическим и физиологическим признакам. Значительные изменения уровня норадреналина в плазме крови и дофамина в мозгу показательны и интересны как сами по себе, так и как вероятное отражение других регуляторных сдвигов, заслуживающих дальнейшего изучения. Одновременные изменения эмоционального статуса — депрессия поведенческой активности белых крыс, сходная в некоторых элементах с эффектами нейролептиков, подавление влечения к алкоголю и, наконец, значительное изменение судорожной готовности по коразоловому тесту, — все это, видимо, следствие комплекса изменений в регуляторных системах. Есть основания полагать, что именно продукция антител к сиднофену, способных связывать какие-то эндоген-

ные аналоги этого соединения, обуславливает все описанные процессы. Об этом свидетельствует и динамика процесса, соответствующая динамике иммунизации, и тот факт, что иммунизация одним антигеном-носителем не дает столь выраженных эффектов. Тем не менее доказать роль антисиднофеновых антител могут только прямые эксперименты по их действию на эндогенные регуляторы. Результаты настоящего цикла исследований определяют необходимость изучения и ряда других вопросов: более детального изучения динамики иммунизации, специфичности антителогенеза, концентраций катехоламинов в отделах мозга, надпочечниках и других тканях, эффективности метода при воздействии на уже алкоголизованных животных, изменений концентраций не только катехоламинов, но и ряда других эндогенных регуляторов (в первую очередь опиоидных пептидов) и др.

В целом, обобщение данных литературы, представленное в начале статьи, и экспериментальных материалов настоящего исследования позволяет считать перспективным формирующийся путь «инверсной» регуляции, то есть длительной коррекции биохимического и физиологического статуса организма посредством активной иммунизации к биорегуляторам — как эндогенным, так и экзогенным. В медицине можно прогнозировать полезность этого пути в терапии ряда хронических болезней, требующих при обычных способах лечения частого систематического введения лекарств, в частности психических болезней и алкоголизма. В экспериментальной нейрохимии, нейрофизиологии и медицине активная аутоиммунизация к биорегуляторам послужит ценным инструментом в фундаментальных исследованиях механизмов действия биорегуляторов.

**IMMUNOLOGICAL INTERFERENCE IN  
NEUROCHEMICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL  
PROCESSES: CATECHOLAMINES, BEHAVIOUR  
AND SEIZURE ACTIVITY OF WHITE RATS  
IMMUNIZED BY A CONJUGATE OF SERUM  
ALBUMIN AND SYDNOFEN**

Ashmarin I. P., Danilova R. A., Melnik E. I., Obukhova M. F.,  
Saghimbaeva Sh. K., Zirenina M. L., Ganzha S. Yu., Koltovaya N. A.

*Moscow State University and Institute of  
Applied Molecular Biology, Moscow*

The mechanism of inverse regulation, i. e. a possibility of correction of biochemical and physiological status of the body by active immunization against endogenous and exogenous biostimulants, is examined. Immunization by conjugates of Sydnofen and BSA resulted in protracted biochemical and physiological effects. The active immunization of white rats against antidepressant drug (Sydnofen) led to alteration of behavioral activity, inhibition of seizure activity and alcohol abuse development, decreased noradrenaline level in blood and dopamine level in brain for over two months.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Carelli C., Andibert F., Gaillard J.C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.79, p.5392—5395, 1982.
2. Spencer G.S.G., Harvey S., Andsley A.R.S., Hallett K.G., Kastin S. Comp. Biochem. Physiol., v.85A, p.553—556, 1986.
3. Ашмарин И.П., Гомазков О.А. Изв. АН СССР, Серия биол., N1, с.11—18, 1989.
4. Крыжановский Г.Н., Есеев В.А. Вести. Акад. мед. наук СССР, N3, с.10—14, 1988.
5. Давыдова Т.В., Башарова Л.А., Ковалев И.Е., Есеев В.А. Фармакология и токсикология, N2, с.57—58, 1987.
6. Michel J.B., Guetter C., Galen F.X., Philippe M., Corvol P., Menard J. II-th Sci. Meet. Intern. Soc. Hypertension. Abstr.0822, p.407, 1986.
7. Mori K. J. Chromatogr., v.218, p.631—637, 1981.
8. Данилова Р.А., Обухова М.Ф., Ашмарин И.П., Машковский М.Д. Докл. АН СССР, т.303, с.1512—1514, 1988.
9. Данилова Р.А., Обухова М.Ф., Сагимбаева Ш.К., Машковский М.Д., Ашмарин И.П. Биол. науки, N3, с.63—69, 1989.

Поступила 20.04.1989

