

С.И. Игонькина, Л.А. Ветрилэ, М.Л. Кукушкин

Роль антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в механизмах невропатической боли

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Цель исследования — изучение роли антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в патогенезе невропатической боли. Показано, что развитие экспериментального невропатического болевого синдрома сопровождается продукцией аутоантител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы — ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину. Установлено, что антитела к нейромедиаторам антиноцицептивной системы оказывают проноцицептивное действие.

Ключевые слова: невропатическая боль, антиноцицептивная система, нейромедиаторы, антитела к ГАМК, серотонину, норадреналину, дофамину

S.I. Igonkina, L.A. Vetrile, M.L. Kukushkin

The role of antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system in mechanisms of neuropathic pain

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

The present investigation was undertaken in order to study the role of the antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system in pathogenesis of neuropathic pain on models of neuropathic pain. It was shown that the development of experimental neuropathic pain syndrome is accompanied with induction of autoantibodies to GABA, serotonin, noradrenalin and dopamine. It was established that the antibodies to neurotransmitters of antinociceptive system have a pronociceptive effect.

Key words: neuropathic pain, antinociceptive system, neurotransmitters, antibodies to GABA to GABA, serotonin, noradrenalin, dopamine

В последние десятилетия накапливается фактический материал, который свидетельствует о роли иммунологических механизмов в развитии неврологических заболеваний. Показано, что антитела, направленные против нейромедиаторов и их рецепторов, участвуют в патогенезе многих неврологических заболеваний. Так, антитела к нейромедиаторам и их рецепторам обнаруживаются при эпилепсии, синдроме Гийена—Барре, рассеянном склерозе, энцефалите, мультифокальной моторной невропатии, у пациентов с геморрагическим и ишемическим инсультами [1, 8, 10, 14, 16, 19]. Однако вопрос о роли антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы в патогенезе невропатической боли остается открытым.

Антиноцицептивная система осуществляет контроль активности ноцицептивных нейронов и ее деятельность влияет на болевую чувствительность и анальгезию [6, 7, 18]. Нарушение антиноцицептивной регуляции на раз-

ных уровнях ЦНС способствует формированию базисных нейрональных механизмов невропатической боли [4, 5, 12, 13]. Особую роль в антиноцицептивной модуляции невропатической боли играют нейромедиаторы ГАМК, серотонин, норадреналин и дофамин. Дефицит ГАМКергического и моноаминергического торможения в антиноцицептивной системе приводит к развитию характерных признаков невропатической боли [4, 6, 7]. Напротив, использование агонистов ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов у пациентов с невропатическими болевыми синдромами демонстрирует их высокую терапевтическую эффективность, а блокаторы обратного захвата нейромедиаторов норадреналина и серотонина оказывают обезболивающее действие при невропатической боли, резистентной к традиционным анальгетикам [7, 11, 12, 15, 17, 18].

Цель исследования — изучение роли антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы — ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину в развитии невропатической боли. В задачи исследования входило выяснение возможности образования аутоантител к ГАМК, серотонину, норадреналину и

Для корреспонденции: Игонькина Светлана Ивановна, д-р биол. наук, главн. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН, 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8. E-mail: labpain@rambler.ru

дофамину у животных с невропатической болью и установление особенностей протекания невропатического болевого синдрома у животных, иммунизированных соответствующим конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок.

Методика

Работа выполнена на крысах-самцах Wistar массой 220—250 г в соответствии с этическими требованиями, предусмотренными Международной и Российской ассоциациями по изучению боли при проведении поведенческих и нейрофизиологических исследований на животных.

Моделирование невропатической боли

В работе использованы две экспериментальные модели невропатической боли: модель периферической невропатической боли и модель центрального болевого синдрома.

Модель периферической невропатической боли создавали повреждением седалищного нерва. Для этого у животных в условиях гексеналового наркоза обнажали нерв, и после наложения лигатуры нерв перерезали дистальнее места перевязки. О возникновении у животных невропатического болевого синдрома свидетельствовала реакция аутономии, т.е. реакция самоповреждения пальцев ипсилатеральной задней конечности. Для оценки выраженности невропатической боли использовали общепринятую 11-балльную шкалу степени аутономий, учитывающую повреждение когтей, фаланг и стоп оперированной лапы [9]. Динамику процесса учитывали ежедневно на протяжении 63 дней после операции.

Для моделирования невропатического центрального болевого синдрома использовали метод агаровой пластинки [4]. Агаровую пластинку, содержащую в исходном растворе антагонист ГАМК_A рецепторов — пенициллин или антитела к ГАМК апплицировали животным под эфирным наркозом после ламинэктомии на дорсальную поверхность люмбального отдела спинного мозга (L4—L6). Для количественной оценки спонтанных приступов и механической аллодинии, возникающих у животных с моделью центральной невропатической боли, использовали аккумулятивный показатель аллодинии (АПА) и аккумулятивный показатель спонтанных приступов боли (АПБ) [3]. Показатель АПА учитывал выраженность аллодинии в баллах изону ее распространения, определенную по количеству точек, тактильное раздражение которых вызывало болевую реакцию. Показатель АПБ учитывали интенсивность болевых приступов в баллах и их общую длительность в фиксированном (1 мин) интервале времени.

Иммунологические методы

Наличие аутоантител к нейромедиаторам определяли в сыворотке крови животных с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), проводимого на полистироловых планшетах, сенсбилизированных соответствующими тест-антигенами. Содержание антител оценивали по оптической плотности сыворотки крови при длине волны 495 нм с использованием считывающего устройства «MINI-READER» фирмы «DYNATECK» (Швейцария) и выражали в условных единицах активности (усл.ед.) показателем К, представляющим собой отношение оптической плотности сыворотки крови каждого подопытного животного к среднему значению оптической плотности сыворотки интактных крыс. Специфичность антител определяли в реакции конкурентного торможения нейромедиатором. Аутоантитела к нейромедиаторам в сыворотке крови животных с невропатическим болевым синдромом определяли на 14-е и 28-е сут. после операции.

Антитела к ГАМК в виде гамма-глобулиновых фракций выделяли из сыворотки крови кроликов, гипериммунизированных конъюгированным антигеном ГАМК-бычий сывороточный альбумин (БСА), методом переосаждения сульфатом аммония, очищения диализом и лиофилирования. Аналогичным образом выделяли гамма-глобулиновую фракцию у интактных неиммунизированных кроликов, которую использовали для введения животным контрольной группы.

Для иммунизации животных использовали конъюгированные антигены ГАМК-БСА, серотонин-БСА, норадреналин-БСА и дофамин-БСА, которые вводили по следующей схеме:

1-я инъекция — введение конъюгированного антигена (2 мг на кг массы, 0,5 мл) с полным адьювантом Фрейнда подкожно в 6 точек поясничной области спины за 2 нед. до операции на нерве;

2-я — внутрибрюшинная, через 2 нед. после первой иммунизации в дозе 5 мг на кг массы без адьюванта;

3-я — внутрибрюшинная, через 4 нед. после первой иммунизации в дозе 10 мг на кг массы без адьюванта;

4-я — реиммунизация через 1 мес. после 3-й инъекции конъюгатом в дозе 15 мг на 1 кг массы без адьюванта.

Животным контрольных групп вводили 0,9% NaCl или БСА.

Статистическую и математическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excell и Statistica 6.0, использовали метод Фишера, t-критерий Стьюдента, критерий Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

**Индукция аутоантител к нейромедиаторам
у крыс с невропатическим болевым синдромом, вызванным повреждением седалищного нерва**

Аутоантитела к нейромедиаторам	Показатели			
	Показатель К (усл. ед.), показывающий наличие аутоантител к нейромедиатору		Частота выявления аутоантител к нейромедиатору	
	14 сут.	28 сут.	14 сут.	28 сут.
Аутоантитела к ГАМК (n=10)	1,45±0,06 *	1,55±0,02 *	67% *	17%
Аутоантитела к серотонину (n=10)	1,87±0,18*	1,72±0,11*	77% *	74% *
Аутоантитела к дофамину (n=10)	2,5±0,17	1,85±0,11*	88% *	90% *
Аутоантитела к норадреналину (n=10)	1,56±0,09*	1,57±0,1*	73% *	60% *

Примечание. * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия по сравнению с интактными крысами

Результаты и обсуждение

В 1-й серии экспериментов исследовали сыворотку крови животных с невропатическим болевым синдромом, вызванным повреждением седалищного нерва, на наличие аутоантител к нейромедиаторам в динамике на 14-е и 28-е сут. после операции. В эти сроки у животных невропатический болевой синдром достигал максимального развития. Данные об уровне антителообразования к нейромедиаторам при развитии невропатической боли у подопытных животных представлены в таблице. Как видно из таблицы, аутоантитела ко всем исследуемым нейромедиаторам выявлены в большом проценте случаев. У интактных крыс антитела к исследуемым нейромедиаторам не были выявлены.

Во 2-й серии экспериментов изучали особенности протекания невропатического болевого синдрома у животных при их иммунизации соответствующим конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок в динамике в течение 63 сут.

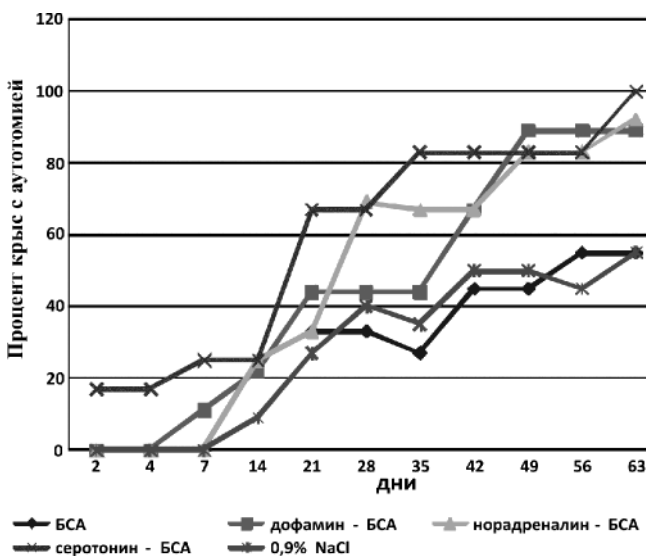


Рис. 1. Развитие невропатического болевого синдрома у крыс на фоне иммунизации конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок. По оси ординат — процент животных с аутоиммунитетом, по оси абсцисс — дни тестирования после перерезки нерва

Как показали эксперименты, иммунизация животных антигеном серотонин-БСА (n=10), норадреналин-БСА (n=10) или дофамин-БСА (n=10) изменяла течение болевого синдрома, у подопытных животных болевой синдром протекал тяжелее. На фоне иммунизации существенно возрастал процент животных с аутоиммунитетом (рис. 1). При этом, если в контрольных группах после перерезки нерва процент животных с аутоиммунитетом равнялся 45—55%, то в опытных группах у животных, иммунизированных конъюгатом норадреналин-БСА и дофамин-БСА, достигал 90%, а иммунизированных конъюгированным антигеном серотонин-БСА-100%.

На рис. 1 и 2 в легенде обозначены группы животных: 0,9% NaCl — контрольная группа животных, БСА — группа животных, иммунизированных бычьим сывороточным альбумином (БСА), серотонин-БСА — группа животных, иммунизированных конъюгатом серотонин-БСА, норадреналин-БСА — группа животных, иммунизированных конъюгатом норадреналин-БСА, дофамин-БСА — группа животных, иммунизированных конъюгатом дофамин-БСА.

Интенсивность аутоиммунитета у иммунизированных крыс превышала интенсивность аутоиммунитета у неиммунизированных животных. В опытных группах процент животных со среднеинтенсивными и высокоинтенсивными аутоиммунитетами был больше, чем процент таких животных в контрольной группе ($p < 0,05$). Среди животных, иммунизированных конъюгатом серотонин-БСА, преобладали (75%) животные со среднеинтенсивной в 3—6 баллов и высокоинтенсивной в 7—11 баллов аутоиммунитетом, среди иммунизированных конъюгатом дофамин-белок, преобладали крысы со средней выраженностью аутоиммунитета в 3—6 баллов, а в группе животных, иммунизированных конъюгатом норадреналин-БСА, высокоинтенсивные аутоиммунитеты были более чем у половины животных (рис.2А). В контрольной группе у большинства животных выраженность болевого синдрома составила 1—2 балла (рис. 2А).

Существенным образом иммунизация влияла на поздние сроки развития болевого синдрома (рис. 2Б). Начиная с 7-й нед., отмечалось разнонаправленное течение процесса у контрольных и подопытных крыс. В контрольной группе болевой синдром уменьшался, число животных с аутономией снижалось с 70% до 55%, наступала фаза восстановления (рис. 1Б), а в опытных группах фаза восстановления отсутствовала, частота аутономий в группе возрастала до 100%, у животных наблюдали поздние аутономии. Таким образом, у неиммунизированных животных происходило выздоровление, а у иммунизированных возникало обострение процесса.

Уровень аутоантител к нейромедиаторам у иммунизированных животных был значительно выше, чем у животных контрольной группы ($p < 0,05$). Через 9 недель у неиммунизированных крыс аутоантитела к нейромедиаторам уже не обнаруживались ($K=0,820,16$ усл. ед.), а у иммунизированных конъюгатами серотонин-БСА, норадреналин-БСА и дофамин-БСА крыс показатели уровня аутоантител соответственно равнялись $K=3,160,71$ усл. ед., $K=4,050,5$ усл. ед. и $K=3,550,71$ усл. ед.

Таким образом, данные исследования свидетельствуют, что развитие невропатического болевого синдрома, сопровождается образованием аутоантител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы и что на фоне повышенной индукции аутоантител к этим нейромедиаторам, вызванной иммунизацией животных конъюгированным антигеном нейромедиатор-белок, происходит усиление невропатического болевого синдрома.

В 3-й серии экспериментов изучали эффекты антител к нейромедиатору ГАМК на болевую чувствительность при непосредственном введении антител в ключевую структуру ноцицептивной системы — в дорсальные рога люмбального отдела (L4-L6) спинного мозга. Эффекты антител к ГАМК сравнивали с эффектами блокатора ГАМК_A рецепторов. Интратекальное (L4-L6) введение антагониста ГАМК_A рецепторов — пенициллина вызывало у животных ($n=6$) развитие невропатической боли — центрального болевого синдрома. Начальные проявления центрального болевого синдрома в виде аллодинии и спонтанных приступов боли возникали через 5—10 мин после аппликации пенициллина и достигали максимальных величин через 30 мин, при этом показатели центрального болевого синдрома равнялись АПА = $61,5 \pm 4,5$ и АПБ = $121 \pm 20,5$.

Интратекальное введение животным ($n=6$) 300 мкг антител к ГАМК приводило к появлению у подопытных животных механической аллодинии (рис. 3). Легкое тактильное воздействие кисточкой на дерматомы, подвергшиеся воздействию антител к ГАМК, вызывало у всех животных болевую реакцию. Начальные проявления аллодинии так же, как и при введении пенициллина, возникали через 10—15 мин ($АПА = 21,1 \pm 4,3$). К 30-й минуте после аппликации антител к ГАМК интенсивность и площадь аллодинии достигала максимальных значений ($АПА =$

$34,6 \pm 17,08$), через 60 мин регистрировали ее минимальные значения ($АПА = 9,2 \pm 1,6$). Спонтанные приступы при введении 300 мкг антител к ГАМК не возникали. Механическая аллодиния, вызванная антителами к ГАМК была менее выражена, чем аллодиния, вызванная антагонистом ГАМК_A рецепторов. У контрольных животных ($n=6$), которым интратекально вводили γ -глобулин, ни аллодинии, ни спонтанных приступов не наблюдали.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что развитие невропатического болевого синдрома сопровождается продукцией аутоантител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы — ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину, и что на фоне повышенной продукции антител к нейромедиаторам антиноцицептивной системы у животных происходит усиление невропатической боли, провоцируется аллодиния, не наступает фаза выздоровления. Анализ влияния антител к ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину на развитие невропатической боли позволяет сделать следующее заключение о роли антител к

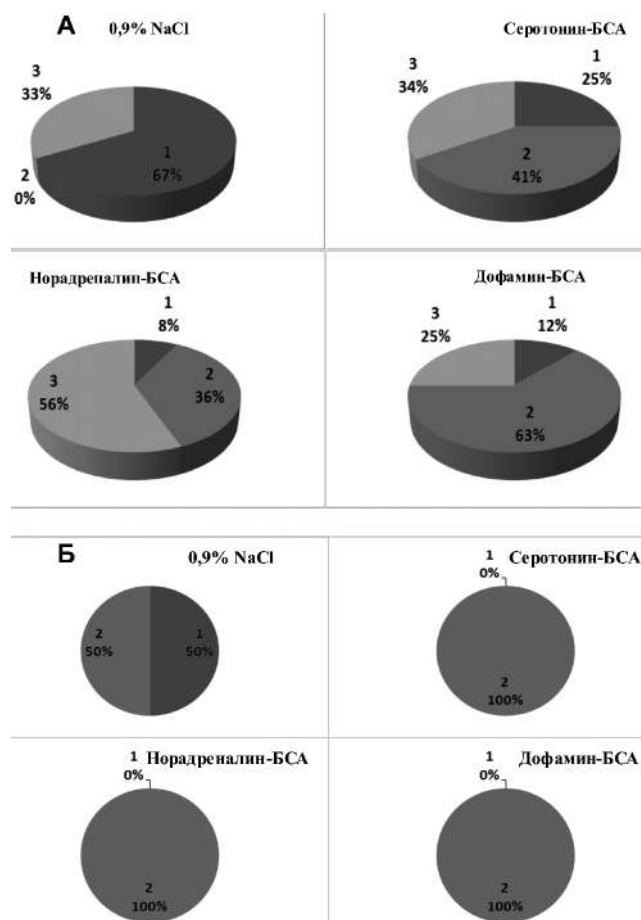


Рис. 2. Влияние иммунизации конъюгатом нейромедиатор-белок на выраженность невропатического болевого синдрома у крыс: А — процентное соотношение крыс с низко- (1), средне- (2) и высокоинтенсивной (3) аутономией; Б — процентное соотношение крыс с наличием фазы выздоровления (1) и наличием поздних аутономий (2)

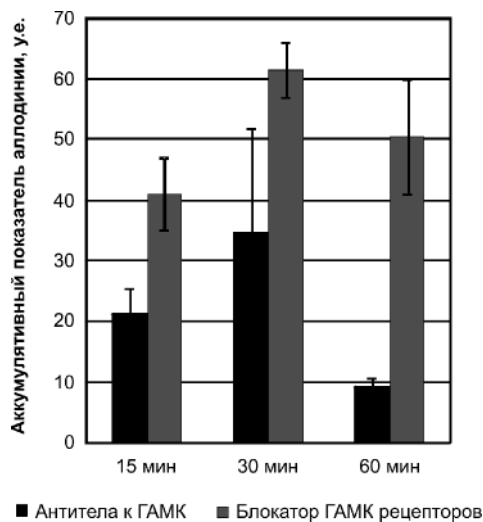


Рис. 3. Аллодиния, вызванная интратекальным введением крысам антител к ГАМК и блокатора ГАМК_A рецепторов в дорсальные рога люмбального отдела спинного мозга. По оси ординат: аккумулятивный показатель аллодинии (АПА), выраженный в условных единицах. По оси абсцисс: время после интратекального введения веществ

нейромедиаторам ангиоцицептивной системы в развитии невропатической боли: антитела к ГАМК, серотонину, норадреналину и дофамину обладают проноцицептивным действием. Этот эффект может быть обусловлен изменением синаптической нейромедиации. В литературе имеются сообщения, что нейромодулирующие влияния антител могут опосредоваться как за счет изменения уровня нейромедиаторов, так и за счет изменения лигандсвязывающей активности соответствующих рецепторов [2].

Список литературы

1. Давыдова Т.В., Колобов В.В., Горбатов В.Ю., Захарова И.А., Ветрилэ Л.А., Фомина В.Г., Феденко А.М. Антитела к глутамату, нейродегенеративные повреждения головного мозга. Перспективы иммунотерапии // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №3. — С. 26-29
2. Евсеев В.А., Трекова Н.А., Ветрилэ Л.А., Миковская О.И., Башарова Л.А., Грудень, М.А., Хлопушина Т.Г. Нейромодулирующее влияние антител к серотонину на поведенческие реакции, уровень нейромедиаторов в ЦНС и лигандсвязывающую активность рецепторов у мышей линии C57Bl/6 и BALB/c // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2001. — Т. 132, №7. — С. 26-29.
3. Игонькина С.И., Кукушкин М.Л., Чурюканов М.В., Чурюканов В.В., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Грецкая Н.М. Анальгетическое влияние агонистов каннабиноидных рецепторов на неврогенную боль центрального происхождения // Патогенез. — 2005. — Т. 3, №3. — С. 71-75.
4. Крыжановский Г.Н., Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Игонькина С.И., Графова В.Н., Смирнова В.С.

Патологические интеграции в системе болевой чувствительности при центральном болевом синдроме // Боль. — 2004. — №4 (5). — С. 10-15.

5. Кукушкин М.Л. Невропатическая боль у пациентов с хроническими болями в спине // Боль. — 2008. — №3 (20). — С. 41-46.

6. Кукушкин М.Л., Решетняк В.К. Хронический болевой синдром или боль как самостоятельная форма болезни // Патогенез. — 2003. — №1. — С. 34-42.

7. Кукушкин М.Л., Хитров Н.К. Общая патология боли. — М.: Медицина, 2004. — 144 с.

8. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. — М., 2005. — 158 с.

9. Пшеничкова М.Г., Попкова Е.В., Смирнова В.С., Шимкович М.В., Мальшиев И.Ю., Кукушкин М.Л. Роль катехоламинов в изменении устойчивости к развитию невропатического болевого синдрома при стрессорном воздействии у крыс линии Август и популяции Вистар // Российский журнал боли. — 2011. — 1. — С. 12-16.

10. Скоромец А.А., Дамбинова С.А., Илюхина А.Ю., Сорокоумов В.А. Аутоантитела к глутаматным рецепторам NMDA-типа в крови пациентов с острым ишемическим и геморрагическим инсультом // Журнал неврологии и психиатрии. — 1997. — №6. — С. 53-58.

11. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л., Давыдов О.С., Данилов А.Б., Амелин А.В., Куликов С.М. Результаты Российского эпидемиологического исследования распространенности невропатической боли, ее причин и характеристик в популяции амбулаторных больных, обратившихся к врачу-неврологу // Боль. — 2008. — №3 (20). — С. 24-32.

12. Яхно Н.Н. Методические рекомендации по диагностике и лечению невропатической боли. — М.: Изд-во РАМН, 2008.

13. Basbaum A., Bushnell M.C. Pain: Basic mechanisms // Pain 2002 — An Updated Review: Refresher course Syllabus / Ed. M.A. Giamberardino. — Seattle, IASP Press, 2002. — P. 3-7.

14. Brenner T., Sills G.J., Hart Y., Howell S., Waters P., Brodie M.J., Vincent A., Lang B. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy // Epilepsia. — 2013. — Vol. 54, №6. — P. 1028-1035.

15. Finnerup N.B., Otto M., McQuay H.J., Jensen T.S., Sindrup S.H. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal // Pain. — 2005. — Vol. 118. — P. 289-305.

16. Kuwahara M., Suzuki S., Takada K., Kusunoki S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy // J. Neuroimmunol. — 2011. — Vol. 239, №1-2. — P. 87-90.

17. Loubser P.G., Akman N.M. Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain // Pain Symptomgmt. — 1996. — Vol. 12. — P. 241-247.

18. Rowbotham M.C. Neuropathic pain: from basic science to evidence-based treatment // Pain. — 2002. — An Updated Review: Refresher course Syllabus / Ed. M.A. Giamberardino. — Seattle, IASP Press, 2002. — P. 165-176.

19. Tsutsui K., Kanbayashi T., Tanaka K., Boku S., Ito W., Tokunaga J., Mori A., Hishikawa Y., Shimizu T., Nishino S. Anti-NMDA-receptor antibody detected in encephalitis, schizophrania, and narcolepsy with psychotic features // BMC Psychiatry. — 2012. — 12. — 37.

Поступила 20.05.13

Сведения об авторах:

Ветрилэ Люция Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. нейроиммунопатологии ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН

Кукушкин Михаил Львович, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБУ «НИИ ОПП» РАМН