

А.И. Смолягин¹, А.С. Симбирцев², И.В. Михайлова¹, Е.В. Ермолина¹, А.А. Исенгулова¹,
Л.А. Пушкарева¹, Н.А. Кузьмичева¹, Ю.В. Филиппова¹, И.Н. Чайникова¹, И.В. Мирошниченко¹

ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПОТОМСТВА, РОДИВШЕГОСЯ ОТ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ТЕТРАПЕПТИД КК1

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург;

²ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург

Резюме. Представлены результаты физиологических и иммунологических исследований крысят, родившихся от самок, которые во время беременности подвергались пассивному курению и воздействию тетрапептида КК1. С 1-х по 21-е постнатальные сутки исследовано соматическое и сенсомоторное развитие потомства с помощью набора тестов, разработанных в Институте нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Уровень цитокинов ИФН γ и ИЛ-6, продуцируемых спленocyтами крысят, исследовали в культуральной жидкости методом ИФА. У крысят, родившихся от пассивно куривших самок, по сравнению с животными, родившимися от некуривших крыс, установлено снижение массы крысят, а также отставание своевременности соматического и сенсомоторного развития. Введение пептида КК1 некурившим самкам повышает ИССР и ИССМР.

Полученные результаты свидетельствовали в пользу развития индуцированного варианта вторичного иммунодефицита у крысят, родившихся от пассивно куривших крыс во время беременности. Введение пептида КК1 некурившим крысам существенно не изменяло иммунологические параметры крысят. Напротив, введение пептида КК1 курившим беременным крысам сопровождалось изменениями количества клеток в лимфоидных органах и продукции цитокинов спленocyтами у родившихся крысят.

Ключевые слова: пассивное курение, крысы, физиологические и иммунологические показатели, тетрапептиды.

Образец цитирования: Смолягин А.И., Симбирцев А.С., Михайлова И.В., Ермолина Е.В., Исенгулова А.А., Пушкарева Л.А., Кузьмичева Н.А., Филиппова Ю.В., Чайникова И.Н., Мирошниченко И.В. Оценка физиологических и иммунологических показателей у потомства, родившегося от пассивно куривших крыс, получавших тетрапептид КК1 // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 75-79.

A.I. Smolyagin¹, A.S. Simbirtsev², I.V. Mikhailova¹, E.V. Ermolina¹, A.A. Isengulova¹,
L.A. Pushkareva¹, N.A. Kuzmicheva¹, Y.V. Filippova¹, I.V. Miroshnichenko¹

EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN THE OFFSPRING BORN FROM PASSIVELY SMOKING RATS TREATED WITH NEUROPEPTIDES

¹Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St.Petersburg

Summary. The results of physiological and immunological studies of rat pups born from females who were exposed to passive smoking and exposure to tetrapeptide KK1 during pregnancy are presented. From the 1st to the 21st postnatal days, the somatic and sensorimotor development of offspring was studied using a set of tests developed at the P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology. The level of cytokines IFN γ and IL-6 produced by rat splenocytes was studied in culture fluid by the ELISA method. In baby rats born from passively smoking females, compared with animals born from non-smoking rats, a decrease in the weight of baby rats was found, as well as a delay in the timeliness of somatic and sensorimotor development. The introduction of the peptide KK 1 non-smoking females increases the index of timeliness of somatic and sensorimotor development.

The results obtained show an induced variant of secondary immunodeficiency in baby rats born from passively smoking rats during pregnancy. Administration of the KK1 peptide to non-smoking rats did not change the immunological parameters of the baby rats. On the contrary, the production of peptide KK1 by pregnant rats who smoked was accompanied by changes in the number of cells in lymphoid organs and the production of cytokines by splenocytes in the born rats

Key words: passive Smoking, rats, physiological and immunological parameters, tetrapeptides.

Известно, что попадание табачного дыма в организм беременных животных при пассивном курении способствует интоксикации, нарушениям функций нервной и иммунной систем, задержке внутриутробного развития. Большое внимание уделяется как созданию экспериментальной модели при пассивном курении, так и поиску веществ, обладающих нейротропным и иммуномодулирующим действием. Одним из них является препарат пептидной природы под лабораторным шифром KK1, обладающий ноотропным и психостимулирующим действием, повышающим устойчивость к стрессу и гипоксии [2, 4, 5]. Общеизвестна связь нервной, эндокринной и иммунной систем. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют работы по влиянию данного препарата на иммунологические показатели. В связи с этим целью данной работы явилось создание экспериментальной модели для оценки влияния тетрапептида KK1 на физиологические и иммунологические показатели крысят, родившихся от пассивно куривших самок, которым в период беременности вводили данный препарат.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были выполнены на 20 половозрелых крысах Вистар и на 52 крысках. Моделирование пассивного табакокурения проводили в камере без поддержания четкого режима влажности. Курящие крысы с 5-го по 20-й день гестации (ежедневно в течение 5 дней в неделю по 8 часов) подвергались фумигации табачным дымом, которая осуществлялась каждые 60 минут дымом, полученным от 1 тлеющей сигареты. Животные контрольной группы в аналогичный период помещались в камеру, вентилируемую атмосферным воздухом без табачного дыма. Начиная со 2-й недели беременности контрольным крысам вводили: I группе (5 крыс) – физраствор (0,2 мл интраназально), II гр. (5 крыс) – пептид KK1 (в дозе 40 мкг/кг/сут. 5 раз через день интраназально). Опытным курившим крысам вводили: III гр. (5 крыс) – физраствор (0,2 мл интраназально), IV гр. (5 крыс) – KK1 (в дозе 40 мкг/кг/сут. 5 раз через день интраназально). Выбор дозы и схема введения иммуномодуляторов обусловлены ранее проведенными исследованиями [3, 5]. Иммуномодулятор синтезирован и любезно предоставлен А.А. Колобовым (ФГУП Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России). Родившиеся крысята были разделены на аналогичные 4 группы. Эвтаназию крысят осуществляли дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом на 21-е сутки после рождения.

С 1-х по 21-е постнатальные сутки исследовано соматическое и сенсомоторное развитие потомства с помощью набора тестов, разработанных в Институте нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Для

оценки индекса своевременности соматического (ИССП) и сенсомоторного развития (ИССМР) каждого крысенка период, в течение которого у крысят проявлялись признаки развития, делился на три части: раннее, среднее и позднее время появления признака. Своевременность развития каждого признака регистрировали в баллах (2, 1 и 0 баллов соответственно). Суммарный индекс своевременности соматического и сенсомоторного развития крысенка рассчитывался путем сложения баллов всех исследуемых признаков.

В соответствии с рекомендациями [1] у крысят определяли: в крови число лейкоцитов, уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови с использованием ПЭГ-6000; в лимфоидных органах – массу и количество клеток. Продукцию цитокинов ИЛ-6 и ИФН γ исследовали в супернатантах культур спленоцитов после 48-часовой инкубации клеток при 37°C в атмосфере 5 % CO $_2$ в полной культуральной среде (RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина и 80 мкг/мл гентамицина). Оценивали спонтанную и индуцированную конканавалином А (Кон А) в конечной концентрации 10 мкг/мл секрецию спленоцитами ИФН γ и ИЛ-6. Уровень цитокинов исследовали в культуральной жидкости с помощью наборов (RayBio Rat IFN-gamma ELISA Kit, U.S.A., RayBio Rat IL-6 ELISA Kit, U.S.A.). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия).

Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0 и представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й и 75-й проценты), а также в виде среднеарифметического значения ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали U-критерии Манна-Уитни, Стьюдента и χ -квадрат.

Результаты и обсуждение

При одинаковом содержании и питании животных средняя масса крысят на 21-й день от рождения была достоверно снижена у животных III гр. ($31,4 \pm 1,2$ г) и IV гр. ($28,5 \pm 0,73$ г) по сравнению с аналогичным параметром контрольной группы ($37,2 \pm 0,55$ г). Оценивая результаты своевременности соматического развития, установлено достоверное снижение ИССП у крысят III гр., по сравнению с контролем, следующих признаков: появление шерсти (на 82,7 %), полное обшерствление (на 65,7 %), появление верхних (на 28,3 %) и нижних резцов (на 27,9 %).

Введение пептида KK1 некурившим самкам приводило к достоверному увеличению всех восьми индексов соматического развития у крысят II гр. по сравнению с аналогичными индексами в I гр.

Аналогичное введение пептида КК1 курившим самкам не выявило существенных отличий среднего ИССР ($8,35 \pm 0,25$) по сравнению с ИССР крысят I гр. ($8,77 \pm 0,47$).

Оценивая 15 параметров своевременности сенсомоторного развития, важно отметить существенное снижение всех исследованных показателей у крысят III гр. по сравнению с контролем. Отмечается наибольшее снижение следующих сенсомоторных признаков: зрительный плейсинг (на 82,7 %), движение ушей (на 62 %), класпинг (на 56,4 %), подъем и спуск по вертикальному канату (на 54,1 %), аудиторный стартл (на 49,4 %).

Введение пептида КК1 некурившим самкам приводило к увеличению 9 из 15 индексов сенсомоторного развития у крысят II гр. по сравнению с аналогичными индексами у животных контрольной I гр. Аналогичное введение пептида КК1 курившим самкам не выявило существенных отличий среднего ИССМР ($16,39 \pm 0,61$) по сравнению с ИССМР крысят I гр. ($16,18 \pm 1,08$).

Таким образом, у крысят, родившихся от пассивно куривших самок, по сравнению с животными, родившимися от некуривших крыс, установлено снижение массы крысят, а также отставание своевременности соматического и сенсомоторного развития. Введение пептида КК1 некурившим самкам повышает выживаемость, ИССР и ИССМР у крысят.

Параллельно исследованию физиологических тестов проведено изучение иммунологических параметров крысят всех групп на 21 день от рождения, при этом в качестве контроля были использованы показатели крысят I гр., родившихся от некуривших крыс. Выявлено отсутствие значимых изменений числа лейкоцитов у крысят всех исследуемых групп. У опытных крысят III гр., родившихся от пассивно куривших самок, по сравнению с контролем, установлено снижение массы тимуса, числа тимоцитов

и спленоцитов при увеличении содержания ЦИК (табл. 1). Введение некурившим крысам пептида КК1 не приводило к существенным изменениям иммунологических параметров у крысят II гр. При введении беременным курившим самкам пептида КК1 у родившихся крысят IV гр. также отмечено снижение массы тимуса, количества тимоцитов и спленоцитов при увеличении содержания ЦИК.

Анализ количества ИФН γ , продуцируемого спленоцитами обследованных крысят, выявил тенденцию к снижению спонтанной продукции ИФН γ у животных II гр. [$162,3$ ($157,5-180,2$) пг/мл] по сравнению с аналогичным показателем у крысят I гр. [$179,0$ ($176,6-181,4$) пг/мл]. Установлено значимое снижение индуцированной продукции ИФН γ у спленоцитов крысят II гр. [$181,4$ ($173-186,8$) пг/мл] по сравнению с крысятами I гр. [$200,5$ ($185,5-229,7$) пг/мл].

Выявлено достоверное снижение спонтанной продукции ИЛ-6 спленоцитами крысят IV гр. [$50,0$ ($38,9-55,1$) пг/мл] по сравнению с аналогичным показателем у животных I гр. [$67,9$ ($51,6-75,2$) пг/мл]. Анализ индуцированной продукции ИЛ-6 спленоцитами показал тенденцию к снижению данного показателя у животных II группы [$75,3$ ($68,5-118,4$) пг/мл] соответственно по сравнению с аналогичным показателем у крысят I гр. [$91,7$ ($72,2-107,1$) пг/мл].

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали в пользу развития индуцированного варианта вторичного иммунодефицита у крысят, родившихся от пассивно куривших крыс во время беременности. Введение пептида КК1 некурившим крысам существенно не изменяло иммунологические параметры крысят. Напротив, введение пептида КК1 курившим беременным крысам сопровождалось изменениями количества клеток в лимфоидных органах и продукции цитокинов спленоцитами у родившихся крысят.

Таблица 1

Иммунологические параметры периферической крови и лимфоидных органов крысят Вистар (Ме, 25-й и 75-й процентиль)

Группа крысят	Лейкоциты, 10^9	Масса тимуса (мг)	Тимоциты ($\times 10^6$)	Масса селезенки (мг)	Спленоциты ($\times 10^6$)	Миело-карициты, 10^6 /орган	ЦИК, ЕД ОП
I (n=18)	4,0 [3,8; 4,6]	126 [117; 137]	167 [145; 173]	95 [84; 111]	118 [108; 137]	25 [22; 28]	25,5 [17; 45]
II (n=12)	5,7 [4,1; 7,0]	113 [90; 124]	175 [150; 221]	75 [66; 100]	98 [95; 102]	21 [18; 23]	26 [14; 30]
III (n=12)	3,6 [3,2; 4,9]	95* [92; 110]	130* [115; 135]	103 [94; 107]	98* [88; 110]	21 [20; 25]	54,5* [35; 64,5]
IV (n=10)	4,4 [3,6; 5,4]	84* [71; 92]	100* [96; 111]	106 [103; 116]	98* [90; 101]	22 [13; 27]	55,5* [47; 64,5]

Примечание: * обозначены достоверные отличия ($p < 0,05$) показателей.

При обсуждении полученных результатов важно отметить, что эндогенная интоксикация самок крыс, вызываемая пассивным курением, обладает отрицательным воздействием как на клеточные сосудистые образования головного мозга с развитием церебральных дисфункций, так и на развитие иммунной системы. В основе выявленных нарушений своевременности соматического и сенсомоторного развития, а также изменений иммунологических параметров может лежать внутриутробная гипоксия и фетоплацентарная недостаточность. В пользу данного предположения свидетельствуют данные литературы о том, что внутриутробная гипоксия связана с повышением концентрации карбоксигемоглобина, содержащегося в табачном дыме, и с вазоконстрикторным действием никотина, вызывающим снижение плацентарного кровотока [8]. Фетоплацентарная недостаточность, возникающая под действием табачного дыма, способствует задержке внутриутробного развития, что проявляется в будущем в снижении массы тела у потомства [7]. Известно, что при действии токсикантов табачного дыма в наибольшей степени страдает лимфоидная линия клеток, так как их полигидроокисленные метаболиты аккумулируются в костном мозге и лимфоидных органах, вызывая гипоплазию центральных и периферических органов иммунитета. Видимый признак такого явления – это уменьшение клеточности в органах кроветворения и лимфоидных органах (селезенка, тимус), что установлено в настоящей работе. В основе положительной тенденции сдвигов физиологических и иммунологических параметров при воздействии пептида КК1 лежит возможное снижение последствий токсического действия табачного дыма за счет противовоспалительного и ноотропного эффекта данных препаратов [5].

Практическая значимость работы заключается в создании экспериментальной модели оценки влияния тетрапептида КК1 на физиологические и иммунологические параметры крысят, родившихся от пассивно куривших самок. Данная работа может являться основанием для создания модели оценки нарушений иммунной системы и разработки методологии с ее использованием при определении эффективности новых иммуномодуляторов у экспериментальных животных.

Список литературы / References

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. – Челябинск: ЧГПУ, 2000. – С. 167.
2. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Церебропротекторные свойства и протеолитическая устойчивость пептидов, гомологичных первичной последовательности участка АКТГ15-18 (экспериментальное исследование) // Цитокины и воспаление. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 65-69.
3. Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Шуматов В.Б., Шестакова Н.В., Гончар Е.Ю. Субстанция в механизмах развития церебральной дисфункции при хроническом табакокурении // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 2. – С. 62-66.
4. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Ларьяновская Ю.Б. Влияние олигопептидов - гомологов фрагмента актг15-18 на состояние печени и надпочечников крыс на модели острого иммобилизационного стресса // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 30-37.
5. Толкач П.Г., Башарин В.А., Гребенюк А.Н., Колобов А.А. Оценка эффективности пептида КК1 для профилактики отдаленных нарушений функций центральной нервной системы после тяжелой интоксикации оксидом углерода в эксперименте // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2015. – Т. 13. – № 3. – С. 29-34.
6. Толкач П.Г., Башарин В.А., Соловьева Т.С., Слуцкая Д.Р. Сравнительная эффективность нейропептидов КК1 и семакса для терапии поражений центральной нервной системы после тяжелого отравления оксидом углерода // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2016. – № 2 (54). – С. 131-137.
7. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А. Механизмы формирования реакций мозга на действие гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – Т. LIX, № 4. – С. 99-110.
8. Deiko R.D., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Cerebroprotective properties of the original peptides homologous to ACTH15-18 primary sequence (experimental study). Cytokines and Inflammation, 2015, No. 14, P. 65-69. Russian.
9. Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A., Shumatov V.B., Shestakova N.V., Gonchar E.Yu. [Substance P in the mechanisms of the development of cerebral dysfunction in chronic tobacco Smoking] // Pacific medical journal. 2016. No. 2. P. 62-66. Russian.
10. Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Laryanovskaya Yu.B. The influence of oligopeptides - the homologues of ACTH15-18 on the liver and adrenal glands in the rats on the model of acute immobilization stress. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, 2017, Vol. 15, No. 4, P. 30-37. Russian.
11. Tolkach P.G., Basharin V.A., Grebenyuk A.N., Kolobov A.A. [Experimental assessment of the KK1 peptide effectiveness for prevention of CNS delayed impairments after acute intoxication with carbon monoxide]// Reviews of clinical pharmacology and drug therapy, 2015. – Vol.13. No. 3, P. 29-34. Russian.
12. Tolkach P.G., Basharin A.V., Solovyeva T.S., Slutskaya D.R. [Comparative effectiveness of neuropeptides KK1 and semax for therapy impairment of central nervous system after acute intoxication of carbon monoxide]//Vestnik of Russian military medical Academy. 2016. No. 2 (54). P. 131-137. Russian.
13. Tyulkova E.I., Vataeva L.A., Samoilov M.O., Otellin V.A. Mechanisms of formation of brain reactions to the action of hypobaric hypoxia at different periods of prenatal development in rats // Journal of obstetrics and women's diseases. – 2010. – T. LIX, № 4. – С. 99-110.

Tiul'kova E.I., Vataeva L.A., Samoïlov M.O., Otellin V.A. [The mechanisms of hypobaric hypoxia-induced alteration in brain development influence of gestational age at exposure]// Journal of obstetrics and women's diseases. 2010. T. LIX. No. 4. P. 99-110. Russian.

8. Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., & Feleszko, W. (2018). Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 1033.

Сведения об авторах:

Смолягин Александр Иванович, д.м.н., профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6, тел. 8(922)8294793; e-mail: probllab.orenburg@mail.ru.

Симбирцев Андрей Семенович, член-корреспондент РАН, профессор ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России.

Михайлова Ирина Валерьевна, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ермолина Евгения Вячеславовна, к.б.н., биолог иммунологической лаборатории Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Исенгулова Айнагуль Акимкиреевна, к.м.н., доцент, доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Пушкарева Людмила Анатольевна, аспирант кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Кузьмичева Наталья Александровна, старший преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Филиппова Юлия Владимировна, к.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Чайникова Ирина Николаевна, д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Мирошниченко Игорь Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автор для переписки

Смолягин Александр Иванович, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6, тел. 8(922)8294793; e-mail: probllab.orenburg@mail.ru.