МУРАМИДАЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОЙ СОМАТИЧЕСКОЙ БОЛИ

Овсянников В.Г.¹, Алексеев В.В.¹, Алексеева Н.С.¹, Алексеева Н.А.¹, Абрамова М.В.¹, Бликян М.В.¹, Лихачева Ю.Е.¹, Бойченко А.Е.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: nataalexeeva@gmail.com

Введение. В статье рассмотрены результаты влияния острой соматической боли на активность мурамидазы (лизоцима) у половозрелых животных и подтверждение того, что активация лизоцима возможна стимулами, не имеющими антигенной природы. Цель исследования: изучить в эксперименте влияние острой кратковременной соматической боли на изменение активности лизоцима у половозрелых крыс. **Материалы и методы.** Эксперимент проводился на белых беспородных крысах, их поделили на две группы: контрольную (где проводили анестезию корня хвоста крысы раствором лидокаина и электрокожное раздражение) и экспериментальную (где моделировали острую соматическую боль электрокожным раздражением корня хвоста животного). Активность мурамидазы в периферической крови определяли по методу Дорофейчук В.Г. (1968) в нашей модификации. **Результаты.** В первой группе статистически значимых изменений не наблюдалось. В ходе экспериментов во второй группе происходило краткосрочное повышение активности мурамидазы сразу после болевого воздействия. В последующей динамике эксперимента ее активность снижалась и через два часа достигала контрольных значений исследуемого субстрата. **Заключение.** При изучении в эксперименте влияния острой кратковременной соматической боли на активность лизоцима у половозрелых крыс было показано повышение активности лизоцима, связанное с субъективным восприятием боли как стрессора и отсутствие некроза тканей в области электрокожного болевого раздражения.

Ключевые слова: мурамидаза, лизоцим, боль, крысы.

MURAMIDASE IN THE PATHOGENESIS OF ACUTE SOMATIC PAIN

Ovsiyannikov V.G.¹, Alekseev V.V.¹, Alekseeva N.S.¹, Alekseeva N.A.¹, Abramova M.V.¹, Blikyan M.V.¹, Likhacheva Y.E.¹, Boychenko A.E.¹

¹FSBEO HE "Rostov State Medical University" Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: nataalexeeva@gmail.com

Introduction. The article describes the results of the influence of acute somatic pain on the activity of muramidase (lysozyme) in mature animals. The purpose of the study. To study the effect of acute short-term somatic pain on the activity of lysozyme in adult rats in the experiment. **Materials and methods.** The experiment was carried out on white outbred rats. Rats were divided into two groups: the control group (with anesthetized tail with lidocaine solution and electro-dermal irritation) and the experimental group (pain modeling by electric-dermal irritation). The activity of muramidase was determined by the method of Dorofeychuk VG (1968) in our modification in peripheral blood. **Results.** There were no statistically significant changes in the first group. A short-term increase of the activity of muramidase occurred immediately after the painful effect during the experiments in the second group. Its activity decreased and after two hours reached control values in the subsequent dynamics of the experiment. **Conclusion.** An increase in lysozyme activity associated with the subjective perception of pain as a stressor and the absence of tissue necrosis in the area of electrodermal pain stimulation was shown during studying the experimental effect of acute short-term somatic pain on lysozyme activity in adult rats.

Keywords: muramidase, lysozyme, pain, rats.

Не вызывает сомнения, что лизоцим (мурамидаза) осуществляет противомикробную защиту организма. Повышение его выработки и активности – закономерный ответ на инфекционную агрессию. Принимая этот тезис как данность, следует признать, что активация лизоцима возможна стимулами, не имеющими антигенной природы.

Информация о вовлечении лизоцима в ответ на неспецифические раздражители появляется в результатах различных научных исследований [1]. Перечень работ можно

продолжать, они публикуются регулярно вплоть до сегодняшнего дня [2; 3].

В исследованиях авторов приводятся сведения об активации лизоцима физическими, химическими факторами, при непосредственном и дистанционном воздействии на организм, *in vivo* и *in vitro* [4; 5].

Среди множества работ по-прежнему уделяется внимание стрессу как инициирующему фактору активации врожденного иммунитета, и в частности лизоцима [6; 7].

В ключе этих исследований изучение влияния острой соматической боли на активность лизоцима представляется оправданным и перспективным.

Цель исследования. Изучить в эксперименте влияние острой кратковременной соматической боли на активность лизоцима у половозрелых крыс.

Материал и методы исследования. В исследовании принимали участие 110 белых беспородных половозрелых крыс–самцов. Все животные распределены на две группы: контрольную (50 животных) и экспериментальную (60 животных). В каждой группе выделяли подгруппу, у которой моделировали острую соматическую боль и подгруппу без болевого воздействия.

Острую соматическую боль воспроизводили электрораздражением области корня хвоста крысы, используя электростимулятор ЭСУ–2. Параметры раздражителя: напряжение – 30 вольт, частота – 1000 Гц, продолжительность импульса – 500 мс, интервал между импульсами 1 мс, продолжительность аллогенного раздражения – 2 мин., достигалась 3-4 степень интенсивности боли по классификации А.В. Вальдмана и Ю.Н. Васильева в модификации В.Г. Овсянникова [8].

Забор крови производили через 2, 30, 60, 120, 180 мин. после аллогенного раздражения. Собранный материал использовали для определения активности мурамидазы. Для определения активности лизоцима по методу В.Г. Дорофейчук [9] в нашей модификации использовалась сыворотка крови животных. Готовят микробную взвесь *Micrococcus lysodeikticus*. Взвесь стандартизирована на ФЭК–56 при использовании зеленого⁴⁵ светофильтра (540 нм). В течение часа инкубируется взвесь микробов в сыворотке крови. Через час смесь встряхивается и нефелометрируется. Разность показателей опытного образца и стандартной культуры характеризует активность лизоцима.

В контрольных опытах анестезия корня хвоста крысы осуществлялась раствором лидокаина.

Гистологические препараты тканей корня хвоста крысы после стандартной обработки окрашивались гематоксилин-эозином и микроскопировались.

Статистическое сравнение данных проводилось на основе U-критерия Манна-Уитни.

Критическое значение уровня значимости (p) принималось равным 0,05. Результаты расчетов представлены как медиана с квантилями и интервалом значений $Me [Q_{0,25}; Q_{0,75}]$ (Min-Max). Работа с экспериментальными животными была произведена согласно Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» от 23 августа 2010 года.

Результаты исследования и их обсуждение. В контрольных опытах фоновый уровень активности лизоцима у крыс составляет $Me=0,267$ ед. [$Q_{0,25}=0,239$ ед.; $Q_{0,75}=0,299$ ед.]. Минимальный уровень активности - 0,115 ед., максимальный - 0,307 ед., обращает на себя внимание, что интерквартильный интервал приближен к максимальному уровню.

Сразу после аллогенного воздействия отмечается всплеск активности фермента. $Me=0,473$ ед. [$Q_{0,25}=0,396$ ед.; $Q_{0,75}=0,485$ ед.]. $Min = 0,33$ ед., $max = 0,502$ ед. ($p<0,001$) (таблица 1).

Через полчаса активность лизоцима начинает падать. $Me=0,389$ ед. $p<0,001$ по отношению к контролю [$Q_{0,25}=0,371$ ед.; $Q_{0,75}=0,412$ ед.]. $Min - 0,309$ ед., $max - 0,426$ ед. Через час от начала эксперимента активность лизоцима продолжает снижаться и принимает значения ниже исходных. $Me=0,175$ ед. [$Q_{0,25}=0,134$ ед.; $Q_{0,75}=0,273$ ед.], $min=0,101$ ед., $max=0,322$ ед., $p<0,001$ по отношению к фоновым значениям. Эта тенденция сохраняется и через 2 часа: $Me=0,102$ ед. [$Q_{0,25}=0,085$ ед.; $Q_{0,75}=0,188$ ед.]. $Min=0,031$ ед., $Max=0,375$ ед. ($p<0,001$ по отношению к предыдущим результатам).

Активность лизоцима достигает своего минимума через 3 часа после долорогенного воздействия $Me=0,106$ ед. [$Q_{0,25}=0,091$ ед.; $Q_{0,75}=0,131$ ед.], $Min=0,076$ ед., $max=0,208$ ед. (рис.1)

Рис. 1. Динамика изменения активности лизоцима у половозрелых крыс до и после нанесения аллогенного раздражения

Таблица 1

Уровень значимости (p) различия данных при попарном сравнении групп

Группы	Контроль	2 мин.	30 мин.	60 мин.	120 мин.	180 мин.
Контроль						
2 мин.	0,000003					
30 мин.	0,000003	0,004795				
60 мин.	0,044254	0,000003	0,000004			
120 мин.	0,000308	0,000005	0,000009	0,007941		
180 мин.	0,000013	0,000003	0,000003	0,001050	0,851934	

В исследованиях на интактных половозрелых животных отмечалась четкая статистически подтвержденная реакция лизоцима на острое болевое раздражение. Она заключалась в повышении активности исследуемого субстрата практически сразу после электроболевой стимуляции. Реакция носила краткосрочный характер. В последующей динамике эксперимента активность лизоцима снижалась и через два часа достигала контрольных значений.

В порядке постановки контрольных опытов производилась анестезия раздражаемой зоны. Наносимое электроболевое раздражение не вызвало в этом случае ответную реакцию со стороны изучаемого субстрата, о чем свидетельствуют нижеприведенные результаты.

Базальный уровень активности лизоцима до аллогенного раздражения составлял $Me = 0,267$ ед. [$Q_{0,25} = 0,239$ ед.; $Q_{0,75} = 0,299$ ед.]. Min значения в общей совокупности результатов наблюдения составили 0,115 ед., $Max = 0,307$ ед. (рисунок 2).

Через 2 мин. после раздражения анестезированной зоны медианные значения активности лизоцима составили 0,280 ед. [$Q_{0,25} = 0,239$ ед.; $Q_{0,75} = 0,301$ ед.], $Min = 0,115$; $Max = 0,307$ ед. При попарном сравнении результатов величина P во всех случаях превышала значение 0,1.

В интервале 30-60 мин. $Me = 0,270$ ед. [$Q_{0,25} = 0,233$ ед.; $Q_{0,75} = 0,298$ ед.], $Min = 0,126$ ед., $Max = 0,301$ ед. При сравнении с контрольными и предыдущими значениями величина P превышала 0,1 (таблица 2).

В последующие 2-3 часа эксперимента картина также не изменилась $Me = 0,284$ [$Q_{0,25} = 0,244$ ед.; $Q_{0,75} = 0,298$ ед.], $Min = 0,126$ ед., $Max = 0,301$ ед. Величина P при попарном сравнении во всех случаях свидетельствовала об отсутствии статистически значимых различий.

Рис. 2. Активность лизоцима при электрораздражении анестезированной прикорневой зоны половозрелых крыс

Таблица 2

Уровень значимости (P) различия данных при попарном сравнении групп

Группы	Контроль	2 мин.	30-60 мин.	120-180 мин.
Контроль				
2 мин.	0,677585			
30-60 мин.	0,705457	0,909722		
120-180 мин.	0,939743	0,545350	0,623177	

Таким образом, наблюдаемые нами изменения активности лизоцима не сопряжены с электрохимическим раздражением рефлексогенной зоны, что дает основание связывать их с болевым компонентом наносимого воздействия.

Нельзя исключать возможность электрохимического повреждения тканей. Сама деструкция тканей может привести в движение факторы врожденного иммунитета, и в первую очередь нейтрофилы, и уже, как следствие, активацию лизоцима.

Иными словами, электростимуляция воспринимается лишь как триггер боли или она приводит к повреждению тканей?

Микроскопическое исследование тканей, подвергнутых контакту с источником электро кожного раздражения, не выявило зон некроза или иных признаков деструктивного поражения. Не обнаружено в исследуемых тканях и кровоизлияний.

Зарегистрированное полнокровие сосудов, частичная утрата поперечно-полосатой исчерченности в миоцитах и их набухание отражают факт раздражения, но отнюдь не повреждения. При этом следует отметить, что выявленные изменения отмечены на поздних этапах эксперимента, тогда как активность лизоцима повышалась сразу после электроболевого раздражения.

На фото 1 отражено обычное строение тканей, где рельефно просматривается роговой слой, сальные железы, волосяные фолликулы, мышцы и их фасции.

Фото 1. Увеличение: окуляр A-Plan 10x/0,25 объектив Pl 10x/18.

Обычное строение тканей

Фото 2. Сразу после электроболевого воздействия

На фото 2 видно, что мышечные волокна сохранены (1), окрашены равномерно, поперечно-полосатая исчерченность сохранена, виден нервный ствол (2).

Фото 3. Через 30 минут после электроболевого воздействия

Отмечен спазм мелких артерий, эндотелиоциты расположены в виде частокола (фото 3).

Фото 4. Через час после электроболевого воздействия

На фото 4 отчетливо показано полнокровие сосудов.

Фото 5. Через час после нанесения электроболевого воздействия

На приведенной фотографии отсутствуют признаки кровоизлияний в ткани (фото 5).

Фото 6. Через 2 часа после электроболевого воздействия

На фотографии отражено исчезновение в мышечном рисунке поперечной исчерченности за счет набухания цитоплазмы, цитоплазма однородна, имеется межмышечный отек (фото 6).

Таким образом, гистологическая картина свидетельствует, что сразу после нанесения электроболевого раздражения, когда отмечается всплеск активности лизоцима, ткани

сохранены. Следствие их раздражения прослеживается позже, через один-два часа от начала эксперимента, как раз тогда, когда активность лизоцима поступательно снижается.

Выводы

1. Повышение активности лизоцима связано с субъективным восприятием боли как стрессора.
2. Анестезия зоны электроболевого раздражения профилактирует повышение активности лизоцима.
3. Электроимпульсное раздражение при избранных параметрах электрораздражения не вызывает некроз тканей.

Список литературы

1. Гундашева Д.И., Сотиров Л.К. Влияние метаболического ацидоза на некоторые показатели неспецифического иммунного ответа у лошадей // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2013. № 1 (17). С. 6-9.
2. Приходько О.В., Бабкина Т.Н. Изменение биохимических и иммунологических показателей при транспортном стрессе у голубей // Научное обозрение. 2015. № 16. С. 10-14.
3. Борисовец Д.С., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Яромчик Я.П. Использование адаптогенов природного происхождения при совершенствовании технологии выращивания телят // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы. 2017. № 3 С. 27-32.
4. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Овчинникова Е.Д., Атрошенко Д.Л., Савин С.С., Белогурова Н.Г., Смирной С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. Влияние различных эффектов на бактериолитическую активность интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца // Acta Naturae. 2017. Т. 9. № 2 (33). С.87-93.
5. Кручинкина Т.В., Гаврилова Ю.А. Влияние йодсодержащего препарата на естественную резистентность глубокостельных коров и их потомство // Дальневосточный аграрный вестник. 2017. № 4 (44). С. 126-131.
6. Кононова О.В., Борисенко А.В., Левицкий А.П. Влияние блокаторов вегетативной нервной системы на состояние пародонта крыс // Вестник стоматологии. 2018. Т. 27. № 1 (102). С. 7-11.
7. Слюсарева Е.Е., Храмова И.А., Антонюк М.В. Влияние транскраниальной электростимуляции на клетки макрофагальной системы у женщин с климактерическим синдромом // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2018. Т. 95. № 3. С. 4-10.
8. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом //

Лабораторное дело. 1968. № 1. С. 28-30.

9. Овсянников В.Г. Очерки патофизиологии боли. Ростов-на-Дону: РГМУ, 2003. 159 с.