

Антитела к нейромедиаторам — возможные биомаркеры предрасположенности к аддиктивному поведению

Давыдова Т.В.¹, Ветрилэ Л.А.¹, Невидимова Т.И.², Ветлугина Т.П.², Фомина В.Г.¹, Батухтина Е.И.², Бохан Н.А.², Захарова И.А.¹, Савочкина Д.Н.²

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Москва, Россия

² — ФГБУ «НИИ психического здоровья СО РАМН», Томск, Россия

В наблюдениях на 80 студентах-добровольцах средних специальных и высших учебных заведений г. Томска показано снижение уровня аутоантител к норадреналину, дофамину и серотонину в сыворотках крови лиц, относящихся к группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ. Уровень антител к глутамату и ГАМК в сыворотках крови студентов, относящихся к группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ, не отличался от контрольной группы студентов, не употребляющих психоактивные вещества. Полученные результаты указывают на вовлеченность аутоантител к норадреналину, дофамину и серотонину в механизмы развития предрасположенности к болезням зависимости и свидетельствуют о возможности их использования в качестве биомаркеров предрасположенности к аддиктивному поведению.

Ключевые слова: антитела, нейромедиаторы, дофамин, норадреналин, серотонин, глутамат, ГАМК, аддиктивное поведение, психоактивные вещества

Введение

Широкое распространение и прием наркотических средств являются существенной социально-экономической и медицинской проблемой. По данным ВОЗ, более 3% жителей нашей планеты страдают от зависимости от психоактивных веществ, включая наркотические вещества. Большая часть людей, страдающих зависимостью от наркотиков, приобщается к наркотикам в молодом возрасте. Разработка новых технологий на основе фундаментальных подходов к диагностике, лечению и профилактике наркотической зависимости среди молодежи является первоочередной задачей современной медицины. Важную роль в решении этой задачи играет изучение и анализ основных факторов риска предрасположенности к наркотической зависимости. Основными методическими подходами к решению проблемы выявления предрасположенности к развитию зависимости от психоактивных веществ в настоящее время являются, с одной стороны, биологический подход, раскрывающий нейробиологические механизмы возникновения и развития аддиктивного поведения, с другой стороны, социальный подход, связанный с причинами возникновения аддиктивного поведения в социуме. Одним из перспективных направлений решения этой проблемы является поиск новых молекулярных маркеров для выявления предрасположенности и ранней диагностики аддиктивного поведения. Аддиктивное поведение формируется на основе взаимодействия генетических, биологических и психосоциальных факторов [1]. Согласно современным представлениям, известно, что психоактивные вещества (наркотики, алкоголь и др.), способные вызывать развитие синдрома зависимости, обладают общим звеном механизма действия, связанного с перестройкой в нейромедиаторных системах лимбико-диэнцефальной системы внутреннего вознаграждения («award system»). В работах И.П. Анохиной и сотрудников [1] убедительно была показана стержневая роль изменений в дофаминовой нейромедиации в мезолимбических структурах мозга

в развитии болезней зависимости. Однако в регуляции дофаминовой нейромедиации участвуют и другие нейромедиаторные системы, нейропептиды, опиоидная система. Наличие тесной взаимосвязи и взаимодействия между нервной и иммунной системами предполагает активное участие иммунной системы в механизмах развития аддиктивного поведения. Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о модуляции функции физиологически активных соединений, таких, как нейромедиаторы, нейропептиды, гормоны специфическими антителами [3]. Установлена тесная взаимосвязь между нарушением функции нейромедиаторных систем и индукцией аутоантител к ним при различных формах патологии ЦНС [3]. Показана возможность образования аутоантител к нейромедиаторам (дофамину, норадреналину, серотонину) при алкоголизме и опийной наркомании в клинике и эксперименте [3, 5]. В связи с этим несомненный интерес представляет поиск новых молекулярных маркеров предрасположенности от психоактивных веществ среди антител к нейромедиаторам (дофамину, норадреналину и серотонину, глутамату, ГАМК), которые могут отражать особенности состояния нейрорегуляторных систем, участвующих в механизмах предрасположенности и развития болезней зависимости.

Целью настоящей работы было изучение содержания аутоантител к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК в сыворотках крови студентов-добровольцев проявляющих интерес и имеющих эпизодический опыт употребления каннабиноидов и амфетаминов и не употребляющих психоактивные вещества.

Методы исследования

Обследовано 80 студентов-добровольцев средних специальных и высших учебных заведений г. Томска. Исследование проведено на базе отделения аддиктивных состояний и лаборатории клинической психонейроиммунологии НИИПЗ СО РАМН. Критериями включения в обследова-

* Работа поддержана грантом РФНФ №12-06-00673

ние были письменное информированное согласие добровольца на участие в исследовании и возраст 18—28 лет. Критериями исключения были наличие психических расстройств, неврологической патологии, соматических расстройств в стадии обострения, наличие антител к морфину в сыворотке крови. По результатам клинического и лабораторного обследования было сформировано две группы: в первую группу вошли 26 студентов (18 мужского и 8 женского пола) с эпизодическим употреблением наркотиков, преимущественно каннабиноидов и амфетаминов, которые были отнесены к группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ, во вторую группу вошли 54 студента (34 мужского и 20 женского пола), не употреблявших психоактивные вещества. Кровь для исследования у добровольцев брали однократно.

В сыворотках крови обследованных студентов определяли содержание иммуноглобулинов IgM, IgG и IgA стандартным методом по Манчини, и антитела к нейромедиаторам, в крови также определяли субпопуляции лимфоцитов CD4, CD8. Определение субпопуляций лимфоцитов осуществлялось на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (компания BD, США) и в иммунофлуоресцентном тесте. В проточной цитофлуориметрии для фенотипирования лимфоцитов использовались 4-цветные реагенты с флуорохромными метками FITC, PE, PERCP, APC (компания BD, США) и моноклональные антитела ООО «Сорбент», г. Москва.

Антитела к нейромедиаторам дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК определяли методом твердофазного ИФА (ELISA) на полистироловых 96-луночных планшетах, сенсибилизированных тест-антигеном. В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиатора с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Конъюгированные антигены дофамин-БСА и серотонин-БСА синтезировали с использованием диазотированного белка [10]. Конъюгат норадреналин-БСА, глутамат-БСА и ГАМК-БСА синтезировали с помощью глутарового альдегида [9]. Тест-антиген вносили в объеме 100 мкл в лунки планшета (Costar, USA) в конечной концентрации 0,3 мкг/лунку. Через 18 часов инкубации при 4°C планшеты 4—5 раз промывали физиологическим раствором с 0,05% твином-20. Тестируемые сыворотки вносили в объеме 100 мкл в 0,05 М фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,4 с 0,05% твином-20 в конечном разведении 1:50. После инкубации в течение 1 часа при 37°C планшеты промывали физиологическим раствором с 0,05% твином-20 3—4 раза и обрабатывали вторичными антителами к IgG человека, меченные пероксидазой хрена («МЕДГАМАЛ» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН), в разведении 1:2000. После часовой инкубации в термостате при 37°C планшеты промывали 3—4 раза физиологическим раствором с 0,05% твином-20 и в лунки добавляли по 100 мкл субстратной смеси, содержащей равные объемы 0,2 М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,1 М раствора лимонной кислоты, 8 мг о-фенилдиамина, 8 мкл 33%-ного раствора H_2O_2 . После часовой инкубации в темноте при комнатной температуре реакцию останавливали 6 н. H_2SO_4 . Содержание антител в каждой лунке оценивали по оптической плотности сыворотки при $\lambda = 492$ нм с использованием считывающего устройства «Mini-reader» («ImmunoChem-2100», USA) и выражали в условных единицах активности, показателем (К), представляющим отношение оптической плотности сыворотки крови каждого больного к среднему значению сывороток крови здоровых доноров.

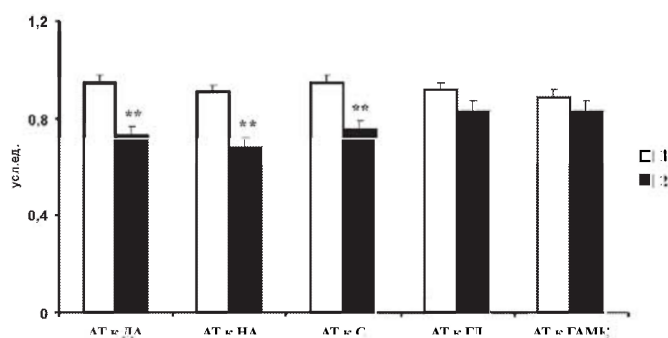
Полученные данные статистически обрабатывали по алгоритмам программы «Statistica 6.0» с использованием не параметрического критерия Манна—Уитни. Критические значения уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимались равными 0,05. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, где M — среднее, SEM — стандартная ошибка среднего.

Результаты исследования

Проведенное сравнительное исследование нейробиологических показателей у студентов-добровольцев из группы риска по формированию зависимости от психоактивных веществ и в контрольной группе условно здоровых лиц позволило выявить наиболее информативные показатели, которые могут являться факторами риска для возникновения зависимости от психоактивных веществ и развития аддиктивного поведения.

Результаты проведенного обследования студентов добровольцев представлены на рисунке и в таблице. Как видно из рисунка, группа студентов, имеющих опыт эпизодического употребления психоактивных веществ (каннабиноидов и амфетаминов), отличалась от группы студентов, не имеющих опыта употребления психоактивных веществ по содержанию в сыворотках крови антител к нейромедиаторам. Так, в группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ было отмечено существенное снижение антител к норадреналину, дофамину и серотонину по сравнению с группой студентов-добровольцев, не употреблявших психоактивные вещества. Уровень аутоантител к глутамату и ГАМК в сыворотках крови обеих обследованных групп не различался.

Как видно из таблицы, содержание иммуноглобулинов IgM, IgG и IgA также не различалось между группой риска по формированию зависимости от психоактивных веществ и группой студентов, не употребляющих эти вещества (наркотики, алкоголь и др.). В крови у студентов, входящих в группу риска по формированию зависимости от наркотических веществ выявлено существенное увеличение как абсолютного, так и относительного содержания субпопуляции CD4 лимфоцитов, а также индекса CD4/CD8 по сравнению с контрольной группой условно здоровых лиц. Увеличение субпопуляции CD4 лимфоцитов может быть связано с двумя типами клонов лимфоцитов, входящих в эту субпопуляцию лимфоцитов CD4 и продуцирующих разные цитокины: Th1 — продуцирую-



Содержание антител к нейромедиаторам в сыворотках крови студентов-добровольцев из группы риска по формированию зависимости от психоактивных веществ и условно здоровых лиц;

1 — группа условно здоровых лиц; 2 — группа риска по формированию зависимости от психоактивных веществ

Содержание иммуноглобулинов и субпопуляций лимфоцитов в крови у студентов-добровольцев из группы риска по формированию зависимости от психоактивных веществ и условно здоровых лиц

Группы студентов	Кол-во студентов	Иммуноглобулины (г/л) в сыворотке крови			Лейкоциты $\times 1000$ в мм^3	Лимфоциты			Субпопуляции лимфоцитов в крови			
		IgM	IgG	IgA		%	Абс. число	CD4, %	CD4, абс. кол-во	CD8, %	CD8, абс. кол-во	CD4/CD8
Группа риска	26	1,1 \pm 0,2	16,1 \pm 2,0	1,8 \pm 0,3	6,6 \pm 0,1	36,1 \pm 1,3	2,1 \pm 0,1	40,0 \pm 1,4	837,3 \pm 61,1	26,5 \pm 0,9	546,4 \pm 36,1	1,65 \pm 0,1
Группа условно здоровых лиц	54	1,3 \pm 0,1	16,8 \pm 0,9	2,1 \pm 0,2	6,1 \pm 0,1	34,2 \pm 0,6	2,0 \pm 0,1	36,1 \pm 1,7	699,35 \pm 21,7	24,9 \pm 0,4	498,1 \pm 15,9	1,46 \pm 0,03
P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	=0,004	=0,02	>0,05	>0,05	=0,05

щие гамма-интерферон и ИЛ-2 и Th2 — продуцирующие ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 [4]. В настоящее время показано изменение цитокинового профиля, в частности повышение уровня ИЛ-6 в сыворотке крови у лиц с опиоидной зависимостью по сравнению с группой условно здоровых лиц, что может быть связано с изменениями в субпопуляции CD4 лимфоцитов [2].

Таким образом, в результате обследования студентов-добровольцев средних специальных и высших учебных заведений г.Томска получены также данные свидетельствующие о снижении уровня аутоантител к норадреналину, дофамину и серотонину в сыворотках крови студентов, относящихся к группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ. Уровень антител к глутамату и ГАМК в сыворотках крови студентов, относящихся к группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ, не отличался от контрольной группы студентов, не употребляющих психоактивные вещества. Полученные данные можно рассматривать как отражение нейроиммунных взаимодействий между норадреналинергической, дофаминергической, серотонинергической системами и аутоантителами к этим нейромедиаторам. Известно, что эти нейромедиаторные системы являются основными в развитии болезней зависимости [1, 11]. По всей вероятности, сниженные уровни антител к норадреналину, дофамину и серотонину в группе риска по формированию зависимости от психоактивных веществ могут соответствовать низким уровням соответствующих медиаторов в мезолимбических структурах мозга и повышенной потребности в стимуляции их выработки психоактивными веществами, а также, возможно, другими экстремальными воздействиями. Наряду с другими изученными в настоящее время физиологическими факторами (сенсорной уязвимостью, пикацизмом, дефицитом железа и др.) содержание антител к нейромедиаторам, а именно к норадреналину, дофамину, серотонину в сыворотке крови, вероятно, позволит оценить риск возможности формирования зависимости от наркотических веществ [5–7]. Полученные результаты указывают на вовлеченность аутоантител к норадреналину, дофамину и серотонину в механизмы развития предрасположенности к болезням зависимости и свидетельствуют о возможности их использования в качестве биомаркеров предрасположенности к аддиктивному поведению.

Список литературы

1. Анохина И.П. Дизрегуляторные расстройства дофаминовой нейромедиаторной системы при алкоголизме и наркоманиях и их коррекция антидепрессантами // Дизрегуляторная патология. — М.: Медицина, 2002. — С. 329–341.
2. Батухтина Е.И., Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Ветлугина Т.П., Ветрилэ Л.А., Бохан Н.А. Особенности нейроиммунорегуляции у лиц с опиоидной зависимостью // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. — 2012. — №6. — С. 9–11.
3. Евсеев В.А. Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии. — М.: Изд-во РАМН, 2007. — 144 с.
4. Игнат'ева Г.А. Иммунная система и патология // Актуальные проблемы патофизиологии (избранные лекции) / Под ред. академика РАМН Б.Б. Мороза. — Медицина, 2001. — С. 57–118.
5. Мягкова М.А., Морозова В.С., Михайлов М.А., Михайлова М.А., Шипицин В.В., Брюн Е.А. Сравнительное определение нейроиммунных показателей для диагностики заболеваний зависимости // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №3. — С. 59–60.
6. Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Ветлугина Т.П., Батухтина Е.И. Иммунофизиологические факторы риска эпизодического употребления наркотиков лицами подростково-юношеского возраста // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №3. — С. 60.
7. Невидимова Т.И., Семке В.Я., Попова Н.М., Павлова О.А., Робенкова Т.В. Роль сенсорных систем в формировании и терапии отклоняющегося поведения и иммунопатологии // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. — 2003. — №1. — С. 24–26.
8. Невидимова Т.И. Пикацизм, дефицит железа, аддикция // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. — 2003. — №4. — С. 57–62.
9. Melmon K.L., Wenstein Y., Bourne H.R. et al. The pharmacological effects of conjugates of pharmacologically active amines to complex or simple carriers: a new class of drug // Mol. Pharmacol. — 1976. — Vol. 12, №5. — P. 701–710.
10. Peskar B., Spector S. Serotonin: Radioimmunoassay // Science. — 1973. — Vol. 179, №80. — P. 1340–1341.
11. Weinschenker D., Schroder J. There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction // Neuropsychopharmacology. — 2007. — Vol. 32. — P. 1432–1451.

References

1. Anohina I.P. Disregulatory disorder dopamine neurotransmitter system in alcoholism and drug addiction and their correction antidepressants // Dizreguljacionnaja patologija — M. Medicina, 2002; S.329–341.
2. Batuhina E.I., Nevidimova T.I., Davydova T.V., Vetlugina T.P., Vetrilje L.A., Bohan N.A. Features neuroimmunoregulation in individuals with opioid dependence // Sibirskij vestnik psichiatrii i narkologii. 2012. №6: S.9–11.
3. Evseev V.A. Antibodies to neurotransmitters in the mechanisms neuroimmunopathologia. — M. Izd. RAMN, 2007; 144 S.
4. Ignat'eva G.A. Immune system and pathology // Aktual'nye problemy patofiziologii (izbrannye lekci) / Pod red. akademika RAMN B.B.Moroza. Izd. Medicina, 2001: S.57–118.

5. Mjagkova M.A., Morozova V.S., Mihajlov M.A., Mihajlova M.A., Shipicin V.V., Bijun E.A. Comparative definition of neuroimmune parameters for the diagnosis of diseases depending // *Patogenez*. 2012; T.10, №3: S.59–60.

6. Nevidimova T.I., Davydova T.V., Vetrilje L.A., Vetlugina T.P., Batukhtina E.I. Immunophysiologic risk factors of occasional drug use by persons of adolescent age // *Patogenez*. 2012; T.10, №3: S.60.

7. Nevidimova T.I., Semke V.Ja., Popova N.M., Pavlova O.A., Robenkova T.V. The role of sensory systems in the formation and treatment of deviant behavior and immunopathology // *Sibirskij vestnik psikiatrii i narkologii*. 2003. №1: S. 24–26.

8. Nevidimova T.I. Pikatsizm, iron deficiency, addiction // *Sibirskij vestnik psikiatrii i narkologii*. 2003; №4: S. 57–62.

9. Melmon K.L., Wenstein Y., Bourne H.R. et al. The pharmacological effects of conjugates of pharmacologically active amines to complex or simple carries: a new class of drug // *Mol. Pharmacol*. 1976; 12, №5: 701–710.

10. Peskar B., Spector S. Serotonin: Radioimmunoassay // *Science*. 1973; 179, №80: 1340–1341.

11. Weinschenker D., Schroder J. There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction // *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32: 1432–1451.

***Antidodies to neuromediators —
possible biomarkers of predisposition to addictive behavior***

**Davydova T.V., Vetrile L.A., Nevidimova T.I., Vetlugina T.P., Fomina V.G.,
Batukhtina E.I., Bohan N.A., Zakharova I.A., Savochkina D.N.**