

адаптации. Повышение мобильности защитных механизмов обеспечивалось перераспределением активности эрготропных и трофотропных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеев Ю.В.* Клинико-нейрофизиологическая и экспериментальная психологическая характеристика острого периода сотрясения головного мозга: Дисс. ... канд. мед. наук. — Минск., 1988.
2. *Глуховской В.В.* Оценка адаптационных реакций и неспецифической резистентности в качестве критерия эффективности диспансерных лечебно-реабилитационных мероприятий у лиц, перенесших легкую закрытую черепно-мозговую травму: Дисс. ... канд. мед. наук. — Киев, 1988.

3. *Алиев З.М.* // Педиатрия. — 1985. — С. 28–31.
4. *Корж Г.С. и др.* Особенности вегетативной регуляции в остром и отдаленном периодах сотрясения головного мозга у детей. — В кн.: Актуальные вопросы клинической педиатрии, акушерства и гинекологии. — Киров, 1992 — С. 75–76.
5. *Ромоданов А.П. и др.* Мультивариантная адаптивная регуляция вегетативных функций при легкой черепно-мозговой травме. — В кн.: Механизмы адаптационного процесса в остром периоде черепно-мозговой травмы. — Москва, 1990. — С. 41–43.
6. *Сумеркина М.М.* Закрытая черепно-мозговая травма у детей: Дисс. ... докт. мед. наук., 1987.

Поступила 01.02.97.

УДК 616.8-097

*М.Н. Сорокина, М.В. Давыдовская, А.В. Романюк,
Н.И. Чалисова, Н.В. Скрипченко, Р.А. Насыров, О.А. Аксенов, О.А. Маркова*

ЗНАЧЕНИЕ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА В РАЗВИТИИ НЕЙРОПАТИЙ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ

НИИ детских инфекций, г. Санкт-Петербург

Р е ф е р а т. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показаны конкурирующие взаимоотношения дифтерийного токсина и фактора роста нервов: в органотипической культуре (300 сенсорных ганглиев) и на модели экспериментальной дифтерийной нейропатии у 66 белых крыс. Представлены доказательства протективного действия фактора роста нервов, ингибирующего токсический эффект дифтерийного токсина. Прослежено содержание свободного токсина и специфических иммунных комплексов у 25 детей с дифтерийной полинейропатией. Благоприятный исход заболевания наблюдался у детей с высоким содержанием фактора роста нервов в сыворотке крови, что в совокупности исследований открывает новый подход к лечению заболеваний нервной системы.

*М.Н. Сорокина, М.В. Давыдовская, А.В. Романюк,
Н.И. Чалисова, Н.В. Скрипченко, Р.А. Насыров,
О.А. Аксенов, О.А. Маркова*

**ДИФТЕРИЯ ТОКСИНАРЫНЫҢ НЕЙРОПАТИЯ
ҮСЕНДӘГЕ УРЫНЫ ҺӘМ НЕРВЛАР ҮСЕШЕ
ФАКТОРЫНЫҢ САКЛАУ ЭФФЕКТЫ**

In vitro һәм *in vivo* экспериментларында дифтерия токсина һәм нервларнын үсеше арасында үзара көрәш мөнәсәбәтләре булу күрсәтелә. Нервлар үсеше факторынын дифтерия токсинары агулау эффектына туктатып торучы һәм көчәйткеч тәэсире булуына дәлиләр китерелә. Дифтерия полинейропатияле 25 балада ирекле токсинар һәм үзенчәкле иммунокомплексы эчтәлеге күзәтелә. Кан сүлендә нервлар үсеше факторы югары булган балаларнын әлеге авырудан тизрәк тазарулары күзәтелә. Бу нерв системасы авыруларын дөвалауга янча якын килу мөмкинлеген тудыра.

*M.N. Sorokina, M.V. Davydovskay, A.V. Romanjuk,
N.I. Chalisova, N.V. Skripchenko, R.A. Nasyrov,
O.A. Aksenov, O.A. Markova*

**SIGNIFICANCE OF DIPHThERIA TOXIN IN
NEUROPATHY DEVELOPMENT AND PROTECTIVE
EFFECT OF NERVES GROWTH FACTOR**

In experiments *in vitro* and *in vivo* competitive relationships of diphtheria toxin and nerves growth factor were shown: in

organotypical culture (300 sensor ganglions) and in model of experimental diphtheria neuropathy in 66 white rats. There were given evidences of protective action of nerves growth factor, inhibiting the toxic effect of diphtheria toxin. Contents of free toxin and specific immune complexes was studied in 25 children with diphtheria polyneuropathy. Favourable outcome of disease was observed in children with high presence of nerves growth factor in blood serum, thus giving new approach in treatment of nervous system diseases.

Эпидемический подъем дифтерии в 90-е годы в нашей стране [2] закономерно привел к изучению дифтерийных нейропатий (ДНП). Новый уровень научных знаний о дифтерийной коринобактерии, строении дифтерийного токсина (ДТ) и путях воздействия его на клетки позволяют продолжить исследование патогенеза развития ДНП как в клинике, так и в эксперименте.

На секционном материале [5], а также в опытах *in vivo* [12, 15] было показано, что при дифтерии происходит поражение нейронов и клеток глии центральной и периферической нервной системы, первично связанное с воздействием ДТ. В настоящее время известно, что ДТ секретируется бактерией в форме проэнзима, состоящего из А и В фрагментов; оба они токсичны по отношению к чувствительным клеткам и ферментативно активны [4, 8, 16, 17]. Фрагмент В специфически взаимодействует с рецепторами, расположенными на поверхности ряда эукариотических клеток и участвует в образовании канала в мембране клетки, через который фрагмент А

транспортируется в цитоплазму. Основной токсический эффект обусловлен фрагментом А, который катализирует перенос АДФ-рибозного остатка с НАДФ на фактор элонгации 2 (ЕФ-2). Последнее приводит к его инактивации, следовательно, к нарушению элонгации пептида в клетке и останавливает синтез белка. В конечном итоге это вызывает либо гибель клетки, либо нарушение ее функции. Так, швановские клетки перестают вырабатывать миелинспецифические белки, в результате происходит деградация миелиновых оболочек, их демиелинизация. Воздействие ДТ на нейрон приводит к альтерации сомы и аксона.

Не вызывает сомнений первичная роль ДТ в развитии у больных ранних ДНП. Одним из доказательств является корреляция частоты и тяжести развития неврологических симптомов в зависимости от степени токсичности дифтерии [6]. Аспекты клинических проявлений ДНП достаточно изучены, но предстоит выяснить, сохраняется ли этот же механизм повреждения нервов и при поздних ДНП или, как считают большинство авторов, в генезе их лежит аутоиммунный процесс, обусловленный демиелинизацией. Несмотря на раскрытый механизм повреждения клетки ДТ, нет работ, в которых на молекулярном уровне было бы предложено конкурентное воздействие факторов, нейтрализующих действие ДТ.

Поиск подобных веществ привел нас к изучению фактора роста нервов (ФРН), являющегося незаменимым биологическим нейромедиатором, вырабатываемым клетками организма [3]. ФРН в процессе онтогенеза непосредственно воздействует на сенсорные и симпатические нервы периферической нервной системы, улучшая их выживание, дифференцировку, стимулируя рост нейритов и синтез нейрофиламентов. Во взрослом организме ФРН влияет на регуляцию синтеза нейропептидов, играет активную роль при развитии патологических процессов непосредственно в нерве [14]. Установлено, что один из трофических эффектов ФРН на нейроны обусловлен его воздействием на фактор элонгации трансляции [11, 13]. В экспериментах на культуре нервной ткани было показано, что ФРН способен предотвращать развитие нейротоксического эффекта при воздействии таксоля [18] на спинномозговые ганглии и оказывать лечебный эффект при экспериментальных периферических нейропатиях [8].

Целью исследования являлось определение значения ДТ в генезе повреждения нервной ткани и выявление защитного воздействия ФРН при ДНП в эксперименте и клинике. Экспериментальные исследования проведены *in vitro*

и *in vivo*. Исследования *in vitro* выполнены на 300 эксплантатах спинномозгового ганглия в 4 сериях опытов: изолированного воздействия ДТ, ФРН и одновременного воздействия ДТ+ФРН на рост нейритов с постановкой контроля (по методу Н.О.Чалисовой, 1991). Использовали стандартный ДТ серии 312, содержащий 150 лф/мл, изготовленный ЦНИИСТ им. Тарасевича. ФРН афинно-очищенный мышечный получали в НИИ физиологии БАН (Минск). Экспериментальные исследования *in vivo* были проведены на 126 белых крысах: в первой серии опытов (60 животных) создана модель ДНП путем подбора адекватной дозы (0,05 лф/100 г массы), которая при однократном внутримышечном введении в левую заднюю лапу, аналогично известному способу [9], создавала на 15-е сутки картину стойкого неврологического поражения n. ischiaticus sinister при отсутствии летальных исходов. Во второй серии опытов (66 крыс) оценивали результат воздействия изолированного и сочетанного введения ДТ, ФРН (1 мг/кг) по сравнению с контролем при ежедневной оценке степени развития пареза по шкале [9], а также патоморфологических и электрофизиологических данных.

В клинике прослежено течение ДНП у 25 больных с различной степенью токсичности дифтерии. Помимо клинко-неврологического обследования, у больных определяли ДТ в свободном состоянии и в составе иммунных комплексов по методу О.А. Аксенова (1995) в КФ-тесте. ФРН в сыворотке крови больных выявляли по модифицированному методу Murase K. et al. [15] прямым радиоиммунным методом и с использованием моноклональных антител к ФРН.

В результате исследований *in vitro* было установлено, что добавление в культуральную среду ДТ вызывало выраженное угнетение роста нейритов, а при высоких концентрациях (0,1–0,1 лф/мл) рост нейритов вообще отсутствовал, наблюдалась лишь миграция глиоцитов. Добавление же ФРН (60 нг/мл) в культуральную среду приводило к интенсивному росту нейритов, достоверно превышающему контроль ($P < 0,01$). При одновременном внесении в культуру ганглия ФРН и ДТ выявлено достоверное блокирование ингибирующего эффекта ДТ, выражавшееся в достаточно интенсивном и равномерном росте нейритов [1]. Исчезновение ингибирующего эффекта ДТ под влиянием ФРН происходило при всех рассматриваемых концентрациях ДТ (0,1–0,0001 лф/мл).

Для дальнейшего углубленного изучения повреждающего действия ДТ и защитного эффекта ФРН были выполнены эксперименты на белых крысах. Клиническое наблюдение

ние за животными проводилось в течение 60 дней. В 1-й группе (контрольной) все животные остались здоровыми. Во 2-й группе (введение ДТ в дозе 0,5 лг/100 г веса) к 15-м суткам заболело 60% крыс, к 25-му дню — 81%, из них у половины наблюдались тяжелые неврологические нарушения в сочетании с общими нейротрофическими нарушениями. В 3-й группе животных, получивших ДТ+ФРН (доза — 1 мг/кг), к 25-м суткам только у одного животного из 16 отмечались нестойкие неврологические нарушения до одного балла.

Сравнение полученных данных ($P < 0,001$) показало, что при одновременном введении ДТ+ФРН дифтерийная нейропатия либо не развивается вообще, либо проявляется в легкой форме в единичных случаях.

Патоморфологические исследования у животных 2-й группы выявили картину прогрессирующего поражения периферического нерва, спинномозгового ганглия и корешков спинного мозга. Более ранними и глубокими были дегенеративные изменения миелиновых оболочек аксонов и поражения сомы нейронов в спинномозговых ганглиях. На 20-30-й дни в нерве определялись отек, очаги деструкции, скопления гипертрофированных швановских клеток, в СМГ были выражены дегенеративные процессы. В 3-й группе животных, получивших ФРН+ДТ, морфологически на тех же сроках наблюдалась сохранность миелиновых оболочек, осевых цилиндров нервов и ганглионарных клеток СМГ. В нерве имела место реактивная пролиферация швановских клеток, возможно, вследствие вызываемой ФРН стимуляции процессов ремиелинизации после повреждения.

Клинические исследования ДНП у детей показали корреляцию тяжести неврологических поражений и течения ДНП, нарастающую при токсических формах дифтерии. У 12 из 25 обследованных больных наблюдалась ранняя ДНП, у остальных 13 больных заболевание прогрессировало в виде поздних ДНП на 3-6-й неделе болезни. При использовании разработанного комплекса тестов по оценке токсинемии при дифтерии было установлено, что в остром периоде инфекции в крови циркулируют как свободный токсин, так и специфические иммунные комплексы.

Образование специфического иммунного комплекса проходит несколько этапов: частичное — со свободными участками антигена (эпитопами), образование полного, но слабоavidного, наконец, высокоavidного комплекса с минимальной константой диссеминации. Данные 4-го этапа отражали инактивацию ДТ

у больных как при ранней, так и при поздней ДНП — от свободного токсина до высокоavidного иммунного комплекса. Уже в остром периоде дифтерии при локализованных формах свободный токсин наблюдался в 51,5% случаев, а слабоavidный иммунный комплекс — в 48,5%, тогда как при токсической форме преобладал свободный токсин или его эпитопы (67,5%), а инактивированный — только в 31,5% случаев. Максимальные значения ДТ наблюдались при субтоксической и токсической дифтерии I степени, резко уменьшаясь при токсической дифтерии II и III степени, что, вероятно, связано с фиксацией иммунных комплексов в органах-мишенях, в частности в периферической нервной системе. При тяжелом течении ДНП с волнообразными периодами ухудшения, клинически проявлявшимися не только усилением бульбарного синдрома, но и развитием генерализованных двигательных нарушений на 3-6-й неделе заболевания, в крови периодически выявлялись свободный токсин и иммунные комплексы, содержащие ДТ, а также неспецифические комплексы, отражавшие иммунопатологические процессы в организме. Можно полагать, что образование ДТ в поздние сроки являлось следствием распада слабоavidных комплексов со свободными эпитопами и «вымывания» специфических фиксированных комплексов из тканей, прежде всего нервной. Нарастание последних наблюдалось в период уменьшения неврологической симптоматики и было прогностически благоприятным, свидетельствуя о процессах сааногенеза.

О репаративных процессах судили по содержанию ФРН у больных ДНП. Выделены 3 основных варианта динамики изменения ФРН в сыворотке крови в зависимости от тяжести и исходов ДНП: 1-й — повышение ФРН до 3600–6800 пг/мл в острой фазе с последующим снижением до 2000 пг/мл в периоде ранней реконвалесценции и благоприятном течении болезни; 2-й — отсутствие существенных колебаний ФРН на протяжении всей болезни (2000 пг/мл), что было характерно для легких случаев; 3-й — низкие значения ФРН на протяжении заболевания (0–75 пг/мл), что наблюдалось при ДНП в случаях летального исхода на поздних сроках или при крайне тяжелом течении ДНП, сопровождающейся развитием не только вегетативных, чувствительных, но и генерализованных двигательных нарушений. Зависимость содержания ФРН от тяжести течения и исходов ДНП свидетельствовала о существенной защитной роли ФРН, направленной на восстановление функций нервной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдовская М.В. и др. // Физиология человека. — 1995. — № 4. — С. 150—155.
2. Иванова В.В. и др. // Росс. вест. перинат. педиатр. — 1995. — № 9. — С. 35—39.
3. Калюнов В.Н. Фактор роста нервов. — Минск, 1984.
4. Крылова М.Д. Дифтерийная интоксикация. — М., 1976.
5. Скворцов М.А. Патологическая анатомия важнейших заболеваний детского возраста. — М., 1946.
6. Сорокина М.Н. и др. // Педиатрия. — 1996. — № 3. — С. 33—35.
7. Anton E.S. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 2795—2799.
8. Apfel S.C. et al. // Ann. Neurol. — 1991. — Vol. 29. — P. 87—90.
9. Cavanagh J.B., Jacobs J.M. // Br. J. Exp. Patol. — 1964. — Vol. 45. — P. 309—322.
10. Gill. D., Pappenheimer A. // Ann. Neurol. — 1991. — Vol. 29. — P. 87—90.
11. Halegona S. Palrich Y. // Cell. — 1980. — Vol. 22. — P. 571—581.
12. Yacobs J.M. // Br. J. Exp. Patol. — 1967. — Vol. 48. — P. 204—216.
13. Koizumi S. et al. // In: Trophic factors and nervjus system. Ed L.A Horrochs raven Press. — N.-Y., 1990. — P. 195—202.
14. Levi-Montalchini R. // Ann. Rev. Neurosci. — 1992. — Vol. 5. — P. 341—362.
15. Murase K. et al. // J. Neurosci Res. — 1992. — Vol. 33. — P. 282—288.
16. Pappenheimer F.V. // J. Hygien. — 1984. — Vol. 93. — P. 307—404.
17. Pappenheimer A.M. // Ann. Dev. Biochem. — 1977. — Vol. 46. — P. 69—94.
18. Peterson E.K., Grain S.V. // Science. — 1982. — Vol. 217. — P. 377—379.

Поступила 08.02.97.



Итак, в генезе поражения периферической нервной системы при дифтерии ДТ играет ведущую роль. Показано защитное действие ФРН, предотвращающее повреждение нервной ткани в эксперименте как на культуре нервного ганглия, так и при моделировании ДНП у животных. В течении ДНП у детей выявлялось содержание ДТ в крови в свободном состоянии или в составе иммунных комплексов в ранние и поздние сроки заболевания. Восстановительные же процессы и исходы ДНП, напротив, коррелировали с динамикой содержания ФРН в сыворотке крови, что свидетельствует о защитной роли данного нейротрофического фактора. Возможным объяснением полученных результатов является конкурирующее влияние ДТ и ФРН на синтез белка на уровне рибосом: если фрагмент А ДТ приводит к блокированию синтеза белка в клетке путем воздействия на фактор элангации 2 [17], то ФРН, наоборот, направлен на поддержание синтеза белка в нейронах на оптимальном уровне [10, 13]. В условиях целого организма ФРН усиливает процесс регенерации периферических нервов за счет стимуляции миграции швановских клеток [7]. Полученные данные могут быть использованы для разработки нового подхода к терапии заболеваний периферической нервной системы.