
На правах рукописи

СОКОЛОВ ОЛЕГ ЮРЬЕВИЧ

**ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДЫ И
ПСИХОМОТОРНОЕ РАЗВИТИЕ ДЕТЕЙ**

03.03.01. – физиология

автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва 2012

Работа выполнена в лаборатории патофизиологии ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАМН (руководитель лаборатории – академик РАН Н.Ф.Мясоедов)

Научные консультанты:

доктор биологических наук

Кост Наталия Всеволодовна

доктор медицинских наук, профессор

Михеева Инна Григорьевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Дубынин Вячеслав Альбертович.

доктор биологических наук, профессор

Захарова Людмила Алексеевна

доктор биологических наук

Башкатова Валентина Геннадьевна

Ведущая организация – ФГБУ НИИ фармакологии РАМН им.В.В.Закусова

Защита диссертации состоится 15 октября 2012 г. в 15.30 часов на заседании диссертационного ученого совета Д 501.001.93 Биологического факультета МГУ им М.В.Ломоносова (119 991, г.Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет).

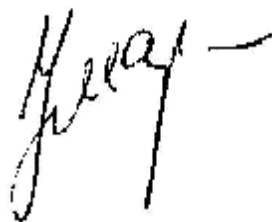
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан 15 сентября 2012 г.

Учёный секретарь

Диссертационного Совета

доктор биологических наук



Б.А.Умарова

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одной из важнейших проблем современной физиологии и педиатрии является проблема гармоничного развития детей, в котором становление психомоторных функций является определяющим процессом. Психомоторное развитие (ПМР) - это поступательное формирование психических (интеллект и темперамент) и двигательных способностей ребенка, в соответствии с его возрастом (Журба, Мастюкова, 1981; Алфимова, Трубников, 2000).

К процессам ПМР относят развитие органов чувств, двигательной сферы, становление психо-социальных контактов (Журба, Мастюкова, 1981; Тонкова-Ямпольская, 1984; Винникот, 1998; Ильин, 2003). К сожалению, патология ПМР у детей – актуальная медицинская и социальная проблема. По эпидемиологическим данным, стресс-индуцированные нарушения ПМР, связанные с поражением мозга в перинатальный период, - ведущая причина дальнейшей биологической и социальной дезадаптации и даже инвалидизации детей (Скворцов, 2000; Вельтищев, Зелинская, 2000; Антропов, Шевченко, 2002; Великанова, 2004; Кешишян, Сахарова, 2011). Таким образом, изучение физиологии ПМР детей, разработка методов его коррекции - важная задача. В этой связи особое внимание привлекают регуляторные системы организма, контролирующие процессы развития ЦНС.

Патологию ПМР связывают, среди прочего, с нарушением обмена нейромедиаторов, опиоидных пептидов в том числе. Опиоидные пептиды относят к многочисленной группе регуляторных пептидов, образующих, по определению И.П.Ашмарина, физиологически непрерывную систему, функциональный континуум. Эти пептиды координируют практически все виды деятельности организма непосредственно или путем модуляции основных медиаторных систем (глутамат- и ГАМК-ергической, ацетилхолиновой, серотониновой, катехоламиновых и др.). Выраженность и направленность биологических эффектов различных регуляторных пептидов очень и очень разнообразны, но в сумме они исполняют роль буферной системы, поддерживающей гомеостаз в организме (Ашмарин, Каразеева, 1996, 1999).

Предполагается, что система регуляторных пептидов является важным фактором сохранения нормальных темпов всестороннего развития детского организма, а «буферная емкость» этой системы определяет предел физиологической выносливости организма, его компенсаторно-адаптационные возможности.

Опиоидная система (ОС) – регуляторная система, вырабатывающая более 40 эндогенных пептидов-биорегуляторов. Физиологическая роль ОС связана, в первую очередь, со снижением болевой чувствительности и защитой от стрессорных повреждений (Kehoe, Blass, 1986; Пшенникова, 1987; Кинтрая и др., 1988; Лишманов, Маслов, 1996; Vodnar, 2011). К настоящему времени ОС взрослого человека изучена относительно подробно (Vodnar, 2003-2011; Vuong et al., 2010). Однако информация об особенностях ОС детей в научной литературе практически отсутствует. Основные исследования, посвященные данной тематике, проводятся на детенышах млекопитающих с экстраполяцией полученных результатов и выводов на человека. Предполагается, что опиоидные пептиды, как эндо-, так и экзогенного происхождения, действительно могут играть важную роль в процессах ПМР ребенка, влияя на созревание и развитие ЦНС (Kehoe, Blass, 1986; Hess, Zagon, 1988). Экспериментально показано, что опиоиды способны дозозависимо модулировать нейрогенез (Hauser, Mangoura, 1998; Hauser et al., 2003; Curtis et al., 2007; Sargeant, 2008). Однако конкретные пути данного воздействия на ЦНС ребенка не ясны и их подробное изучение является актуальной задачей.

Наиболее распространенными опиоидными пептидами в ЦНС и на периферии являются энкефалины. Время их функционирования весьма коротко и определяется активностью ферментов деградации, энкефалиназами. Изучение активности этих ферментов в сыворотке крови детей разного возраста и сопоставление этой активности с уровнем ПМР ранее не проводилось и представляет безусловный интерес. О возможном участии энкефалиназ в нейрогенезе свидетельствует тот факт, что введение их ингибиторов влияет на рост нейроэпителлия у эмбрионов крыс (Spencer-Dene et al., 1994). Следует отметить, что энкефалиназная активность имеет даже более широкое физиологическое значение, поскольку энкефалиндеградирующие ферменты (ЭДФ) гидролизуют не только опиоидные, но и значительное количество других регуляторных пептидов (Гомазков, 1992; Marini et al., 2000; Соколов и др., 2007).

С древних времен известно, что среди ряда факторов, влияющих на развитие новорождённого (наследственность, социальные условия и пр.), особое место занимает характер вскармливания. В этой связи особое внимание привлекает группа регуляторных пептидов, образующихся при гидролизе казеинов молока, среди которых есть и опиоидные пептиды казоморфины (КМ) (Lemieux, Amiot, 1990; Severance et al., 2011; Niebuhr et al., 2011). В экспериментах на животных установлено, что КМ понижают болевую чувствительность (Дубынин и др., 1992), регулируют материнское и детское поведение у

крыс (Дубынин и др., 2001), обладают анксиолитическим (Маклакова и др., 1993) и кардиотропным действием (Mentz P., 1988, 1990). Высказывается предположение о возможном влиянии КМ на созревание различных систем организма новорожденного, в том числе ЦНС, и, следовательно, на темпы ПМР. Однако само наличие КМ в крови детей первого года жизни установлено до сих пор не было. В этой связи изучение содержания КМ в крови детей и его сопоставление с уровнем ПМР весьма актуально. Требуется разрешения и другой фундаментальный вопрос – могут ли КМ быть причиной нарушений ПМР, таких, например, как аутизм?

Итак, предполагается, что опиоидные пептиды, как эндогенные, так и экзогенные пищевого происхождения, могут играть важную роль в процессах ПМР детей. При этом, механизмы их влияния до конца не ясны. Так, например, ряд биологических эффектов КМ трудно объяснить их взаимодействием только с опиоидной системой (Ruthrich et al., 1993). Поэтому остается актуальным поиск новых молекулярных механизмов действия КМ.

Цель данной работы - определить роль и возможные механизмы влияния опиоидных пептидов на психомоторное развитие (ПМР) детей в норме и при его нарушениях.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие **задачи**:

1. Исследовать зависимость активности полиферментной системы деградации опиоидных пептидов в сыворотке крови здоровых детей первого года жизни от пола, возраста, вида вскармливания, выявить ее взаимосвязь с уровнем ПМР, характеристиками темперамента.

2. Изучить скорость гидролиза лей-энкефалина у детей первого года жизни при ряде патологических состояний: при гипоксически-ишемическом поражении (ГИП) ЦНС новорождённых, при задержке внутриутробного развития (ЗВУР), при негармоничном физическом развитии (гипотрофии) и при задержке ПМР у грудных детей.

3. Определить возможную взаимосвязь скорости гидролиза энкефалинов в крови с психологическими особенностями у детей младшего школьного возраста (7-12 лет) в условиях хронического стресса на примере детей с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря (НДМП).

4. Разработать метод радиоиммунного и иммуноферментного анализа содержания экзогенных опиоидных пептидов казоморфинов-7 (КМ-7) быка и человека в биологических жидкостях.

5. Исследовать взаимосвязь содержания КМ-7-иммунореактивного материала (ирКМ-7) в плазме крови детей первого года жизни, находящихся на разных видах вскармливания, с уровнем их ПМР.

6. Установить возможную связь содержания ирКМ-7 быка в моче с тяжестью заболевания при различных формах аутистических расстройств у детей 5-7 лет.

7. Исследовать *in vitro* новые молекулярные механизмы биологического действия КМ-7: способность ингибировать энкефалиндеградирующие ферменты (ЭДФ), а также взаимодействовать с 5-HT₂-серотониновыми и D₂-дофаминовыми рецепторами головного мозга крыс.

8. Изучить способность КМ-7 быка и человека блокировать серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов крови человека *ex vivo*. Определить способность КМ-7 снижать поведенческие проявления гиперфункции серотониновой системы у животных.

Новизна и практическое значение:

Впервые выявлены физиологические механизмы, определяющие роль ОС в формировании конституционально-личностных характеристик детей разного возраста в норме и при различных функциональных состояниях, связанных с воздействием стрессовых факторов. Впервые показана взаимосвязь активности ЭДФ в плазме крови детей с их полом, возрастом, видом вскармливания. Раскрыт ранее неизвестный физиологический механизм влияния вида вскармливания на ОС ребенка, - установлено, что при искусственном вскармливании скорость ферментативного гидролиза опиоидных пептидов в крови детей первого года жизни снижена. Впервые выявлена взаимосвязь скорости гидролиза лей-энкефалина в крови с уровнем ПМР, гармоничностью развития, характеристиками темперамента, уровнем тревожности, как в норме, так и при ряде патологических состояний – при ГИП ЦНС у новорожденных, у грудных детей с задержкой ПМР и у детей младшего школьного возраста с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря. Впервые показано, что при различных стресс-индуцированных нарушениях ПМР реакция опиоидной системы ребенка однонаправлена и выражается в увеличении времени функционирования опиоидных пептидов в крови. Скорость распада опиоидных пептидов в крови может являться биохимическим маркером физиологического состояния ОС, позволяет оценивать ее адаптационные возможности.

Разработан высокочувствительный метод радиоиммунного и иммуноферментного анализа содержания КМ-7 быка и человека в биологических жидкостях с помощью кото-

рого впервые показано наличие ирКМ-7 быка и человека в крови детей первого года жизни, находящихся, соответственно, на искусственном и естественном видах вскармливания, и ее повышение в результате кормления. Обнаружено, что высокое содержание человеческого КМ-7 в крови детей соответствует нормальному уровню ПМР и физиологическому мышечному тону. Напротив, повышенное содержание КМ-7 быка наблюдается у грудных детей с задержкой ПМР и нарушенным мышечным тонусом. Таким образом, показано, что естественное вскармливание создает оптимальные физиологические условия функционирования ОС ребенка и, соответственно, нормального ПМР. Это подтверждает целесообразность продолжительного грудного вскармливания до года включительно. Искусственные смеси должны быть максимально приближены к «золотому стандарту» грудного молока и не содержать большого количества казеина коровьего молока, поскольку попадание в кровь избыточного количества чужеродных регуляторных пептидов приводит к нарушению в функционировании ОС, и может служить причиной задержки темпов ПМР. Проведенное пилотное клинико-биологическое исследование подтвердило возможное участие бычьего КМ-7 в патогенезе аутистических расстройств - выявлена положительная корреляционная связь содержания КМ-7 быка в моче с тяжестью заболевания по Childhood Autism Rating Scale. Предполагается, что повышенное содержание КМ-7 быка в моче может являться дополнительным показателем тяжести состояния и служить критерием для назначения фармако- и/или диетотерапии больным аутизмом. Раскрыт новый молекулярный механизм биологического действия КМ. Методом радиорецепторного анализа и серотонининдуцированной агрегации тромбоцитов установлена способность КМ-7 взаимодействовать с 5HT₂-серотониновыми рецепторами, причем впервые показано, что КМ-7 обладают свойствами антагонистов 5HT₂-серотониновых рецепторов. Данный эффект КМ подтвержден в поведенческих экспериментах на мышах. Таким образом, впервые различными методами продемонстрирована важная физиологическая роль эндо- и экзогенных опиоидных пептидов в регуляции психомоторного развития детей разного возраста.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эндогенные опиоидные пептиды задействованы в механизмах психомоторного развития детей и их адаптации к стрессу, причем как в первые годы жизни, так и в более старшем возрасте. При нарушениях ПМР различного генеза стресс-протективная реакция опиоидной системы ребенка однонаправлена и выражается в увеличении времени циркуляции опиоидных пептидов в крови.

2. В организме детей циркулируют экзогенные опиоидные пептиды пищевого происхождения казоморфины (КМ). КМ грудного женского молока обеспечивают оптимальное психомоторное развитие детей первого года жизни. Повышенное содержание чужеродного бычьего КМ в организме ребенка может приводить к нарушению ПМР, вплоть до развития расстройств аутистического спектра.
3. Опиоидные пептиды обладают множественностью механизмов действия, участвуют в регуляции других нейрохимических систем. Молекулярной мишенью КМ, помимо опиоидной, является серотониновая система.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на: 13-м съезде психиатров России, Москва, 2000; 3-ей международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», г.Суздаль, 2001; 9-м Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2002; 5-ом международном симпозиуме «Химия протеолитических ферментов», Москва, 2002; 3-м съезде биохимического общества, Санкт-Петербург, 2002; VII Конгрессе педиатров России «Детская гастроэнтерология: настоящее и будущее», Москва, 2002; 1-м Всероссийском конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва, 2003; сессии «Актуальные проблемы психоэндокринологии» Всероссийской конференции памяти А.И.Белкина», Москва 2004; 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Paris, 2004; 14-м съезде психиатров России Москва - 2005; IX конгрессе педиатров России, Москва, 2005; 4-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». Д/о «Подмосковье», 2006г; Научно-практической конференции педиатров России «Фармакотерапия и диетология в педиатрии», Москва, 2007; III российском симпозиуме «Белки и пептиды», Пущино, 2007; 6-ом Российском конгрессе по детской нефрологии, Москва, 2007; XII Конгрессе педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» Москва, 2008; 4-м Российском симпозиуме «Белки и пептиды», Казань, 2009; Всероссийской научно-практической конференции «Биологическая психиатрия – клинической психиатрии», Москва, 2010; 4-й международной конференции «Биологические основы чувствительности к психотропным препаратам», д/о «Подмосковье», 2010; Конференции памяти И.П.Ашмарина, Москва, 2010; заседании кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, 2012.

Диссертация была апробирована на межлабораторной конференции ФГБУ НЦПЗ РАМН. По теме диссертации опубликовано 42 печатные работы, в том числе 24 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и тезисы 18 докладов в материалах всероссийских и международных конференций. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 06-04-08257-офи и 10-04-01781-а.

Диссертация изложена на 172 страницах, содержит 11 таблиц, 25 рисунков. Список литературы включает 717 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследованных детей

Клиническое обследование детей проводили в Измайловской ДГКБ г.Москвы: в грудном, I терапевтическом и нефрологическом отделениях, являющихся клинической базой кафедры пропедевтики детских болезней РГМУ; а также в Центре психолого-педагогической реабилитации и коррекции «Тверской» г. Москвы. Предварительно получали информированное согласие матерей. Было обследовано:

46 новорождённых детей (11 практически здоровых и 35 детей с ГИП ЦНС - 20 доношенных и 15 недоношенных). Клиническое обследование проводила врач-неонатолог, к.м.н. Е.Н.Рюкерт. У 20 обследованных новорождённых с ГИП ЦНС в возрасте 3 месяцев исследовали показатели темперамента по Кельмансону. У всех новорождённых определяли скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови.

98 детей в возрасте от 1 до 12 месяцев жизни. Все дети поступили под наблюдение в грудное отделение с направляющим диагнозом ОРВИ, легкое течение. Клиническое обследование проводила врач-педиатр, к.м.н. О.Б.Курасова. У 20 грудных детей в возрасте 3-х месяцев исследовали показатели темперамента по Кельмансону (2000 г.).

При плановом исследовании биохимических параметров перед выпиской из стационара у всех 98 детей утром, после 6-ти часового ночного перерыва в кормлении, исследовали скорость гидролиза лей-энкефалина и содержание ирКМ-7 в плазме крови. У 55 детей содержание ирКМ-7 определяли также через 3 часа после первого утреннего кормления грудным молоком или адаптированной молочной смесью.

Оценка уровня ПМР детей первого года жизни проводилась с использованием количественного метода, позволяющего дифференцировано оценить становление двигательных, речевых и психических функций (Журба, Мастюкова, 1981). По результатам клинического обследования выделили 3 группы детей. Первая (27-30 баллов) – возрастная

норма ПМР. Вторая (23-26 баллов) – группа риска по формированию нервно-психической патологии (запаздывание двигательных и/или психических функций не сочетанных с патологическими неврологическими симптомами и синдромами). Третья (22 балла и ниже) - дети со специфической задержкой ПМР, носящей патологический характер и связанной с поражением ЦНС. Оценка ПМР недоношенных детей велась с поправкой на степень недоношенности с использованием так называемого «скорректированного возраста» (Луковцева, 2002).

20 детей 4-7 лет (10 здоровых и 10 с расстройствами аутистического спектра). Клиническое обследование больных проводила врач-психиатр О.О.Андреева. Тяжесть состояния оценивалась по Childhood Autism Rating Scale в баллах. Отбор здоровых доноров того же возраста осуществляла врач-педиатр, к.м.н. Е.В.Корнеева. У всех детей оценивали содержание КМ-7 быка в моче.

60 детей 7-12 лет, (11 здоровых и 49 с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря, НДМП). Клиническое обследование проводила врач-педиатр, к.м.н. Н.И.Кузнецова. У всех детей определяли скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови. Выборка детей была разделена на 2 под группы в зависимости от наличия или отсутствия клинических проявлений в виде недержания мочи (обосновано с психологической точки зрения). Комплексное психологическое обследование детей с НДМП и их матерей проводили сотрудники кафедры нейро-патопсихологии факультета психологии МГУ им. М.В.Ломоносова под руководством проф. В.В.Николаевой: уровень явной тревожности определяли по методу СМАС в адаптации А.Прихожан; межличностные отношения и характеристики поведения детей - по тесту Рене Жиля; отношение ребенка к болезни оценивали по рисуночному тесту «Когда я болен»; исследование самооценок детей, ожидаемых ими оценок со стороны матерей и экспертных оценок матерей проводилось по методике Т.Дембо-С.Рубинштейн в адаптации А.Прихожан; определение стиля родительского воспитания - по методике А.Варга и В.Столина «Опросник родительского отношения».

Экспериментальные животные

Поведенческое исследование проводилось на 70 беспородных белых мышам-самцах (22 ± 0.2 г) из питомника РАМН «Крюково-Центральное». Для получения мембранной фракции головного мозга использовали 20 белых беспородных крыс-самцов, вес 200-250 г, из питомника РАМН «Столбовая». В течение двух недель до начала экспериментов все животные адаптировались к условиям вивария: температура + 20-22 С, световой режим 12:12 (с 8 до 20 часов), пищевой и питьевой режим ad libitum.

Тест «встряхивание головой»

Влияние КМ-7 на серотониновую систему мышей исследовали в тесте «встряхивание головой» (Хабриев, 2005). Предварительно животные были распределены на гомогенные группы (по 10 мышей) в соответствии с их исходной двигательной активностью в системе Rat-o-Matic (Adea Elektronik AB, Sweden). Гиперфункцию серотониновой системы индуцировали внутрибрюшинным введением предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (5-НТР) в дозе 300 мг/кг. Количество встряхиваний головой у каждой мыши подсчитывали в течение 1 мин через каждые 10 мин на протяжении часа после введения 5-НТР. КМ-7 человека (Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile) и быка (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) в дозах от 0,01 до 1,00 мг/кг и/или налоксон (10 мг/кг) вводили внутрибрюшинно за 30 минут до тестирования.

Определение скорости гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови

Энкефалиназную активность оценивали по скорости гидролиза равномерномеченного ^3H -лей-энкефалина ферментами сыворотки крови при «малых» концентрациях субстрата, соответствующих природным концентрациям энкефалинов в биологических жидкостях и тканях, и выражали параметром время полужизни лей-энкефалина – $t_{1/2}$ в минутах. Продукты гидролиза ^3H -лей-энкефалина разделяли методом тонкослойной хроматографии, как описано (Соколов и др., 2000г). Способность КМ-7 быка ингибировать энкефалиназную активность сыворотки крови оценивали по способности пептида дозозависимо снижать скорость распада ^3H -лей-энкефалина в сыворотке крови *in vitro*.

Определение содержания КМ-7 человека и быка в плазме крови и моче детей

Получение плазмы крови детей и экстракция КМ: кровь с антикоагулянтом (1:10 3% ЭДТА, бацитрацин 150 мкг/мл) центрифугировали 10 мин, 1000 g, при +4С. Плазму замораживали и хранили при -20С. Экстракцию пептидов проводили 0,25 М уксусной кислотой (15 минут; 100°С; 1:10). Пробы замораживали, лиофилизировали и хранили при -70С.

Получение мочи и экстракция КМ-7 быка. Утренняя моча (средняя порция, 30 мл) смешивалась 1:10 с ледяной уксусной кислотой и замораживалась при – 20 С. Выделение и очистку пептидов проводили на картриджах Sep-Pack C-18 (Waters, США) с последующей экстракцией метанолом. Полученные пробы замораживали, лиофилизировали на ротном испарителе SpeedVac (США) и хранили при -70 С не более месяца.

Радиоиммунный анализ (РИА)

Содержание КМ-7-иммунореактивного материала (ирКМ-7) быка и человека в плазме крови грудных детей определяли специально разработанным методом РИА (Соколов и др., 2007).

Получение антисыворотки к казоморфинам. Иммунизацию кроликов для получения антисыворотки к исследуемым пептидам проводили по методу Дмитриева и др. (1982). Бычий и человеческий КМ-7 конъюгировали с высокомолекулярными белками: БСА, РНКазой, хемотрипсином, тиреоглобулином, овальбумином, иммуноглобулинами крупного рогатого скота, каталазой. К смеси добавляли 200 мкл 0,15М NaCl и 1 мл масляного раствора адъюванта Фрейнда. Полученную эмульсию подкожно вводили кроликам 7 раз через 2-3 недели, причем каждый раз пептиды конъюгировали с новым белком для повышения специфичности антисыворотки к казоморфину.

По достижении высокого титра антител, из ушной вены кроликов забирали кровь, выдерживали 25 минут при 37⁰С. Сыворотку получали центрифугированием (1000g, 30 мин, при комнатной температуре), разливали на аликвоты, замораживали и хранили при температуре -20⁰С.

Йодирование пептидов Введение йодной метки в КМ-7 проводили по модифицированному методу R.J.Miller (1978). Очистку йодированных пептидов от свободной метки проводили методом ионообменной хроматографии на QAE-Sephadex A-25 в 50мМ уксусной кислоте с 0,5% бычьим сывороточным альбумином.

Постановка РИА. Лиофилизированные образцы и стандарты растворяли в 25 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащим 0,5% БСА, 0,15 М NaCl и 0.1% твин-20, добавляли полученные ранее антисыворотки в разведении 1:750 для КМ быка и 1:500 для КМ человека. Реакцию проводили при 4⁰С. Через сутки вносили по 100 мкл (30пг) соответствующих йодированных КМ-7. На 4-е сутки инкубации в среду добавляли козью антикроличью антисыворотку, через 2 часа - нейтральную сыворотку кролика и 15% раствор ПЭГ-6000. Пробы центрифугировали (2000g, 30 мин при +4 С), супернатант удаляли, радиоактивность осадка измеряли на гамма-счетчике (Gamma Track, эффективность счета 70%).

Чувствительность метода составила: для КМ-7 быка - 6 фмоль, человека - 25 фмоль. Перекрест в иммунореактивности гептапептидов был менее 5%.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Содержание КМ-7-иммунореактивного материала (ирКМ-7) быка в хроматографических фракциях экстрактов плазмы крови грудных детей, а также в экстрактах мочи детей 4-7 лет с аутистическими расстройствами определяли с помощью специально разработанного конкурентного твердофазного ИФА, как описано Kost et al., (2009).

Постановка ИФА. В постановке ИФА использовали антитела из тех же антисывороток, что и в РИА. Очистку антител проводили методом аффинной хроматографии на колонке с ВгCN-сефарозой-4В, конъюгированной с КМ-7 быка (Sigma, США).

Очищенные антитела 3 суток сорбировали в 96-луночных плашках (Nunc, Denmark). Образцы, хроматографические фракции или стандартные растворы КМ в ELISA-буфере (0.15 М NaCl, 25 мМ Na₂HPO₄ (рН 7.5), 0.2% БСА, 0.05% Твин 20) вносили по 200 мкл в лунку, затем вносили по 50 мкл раствора биотин-КМ-7 (10 фмоль) в том же буфере и инкубировали 1.5 часа при +37С. Вносили по 250 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой (100 нг/мл, Imtek Ltd, Russia) в ELISA-буфере и инкубировали 30 мин при +37°С. Затем вносили по 250 мкл 2.5% раствора тетраметилбензидина (Биосервис, Russia). Через 15 минут реакцию останавливали 50 мкл 1М H₂SO₄ и измеряли поглощение при 450 нм на плашечном ридере «Униплан» (Россия). Неспецифическое связывание (составляло около 10%) определяли в лунках не содержащих сорбированных антител.

Чувствительность метода составило 25 фмоль КМ-7 быка. В данных условиях КМ-7 человека и бета-казеин (Sigma, USA) в 100-кратном избытке не влияли на связывание антител с меченым КМ-7 быка.

Хроматографическая верификация КМ-7-иммунореактивного материала

Гель-фильтрационная ВЭЖХ. Молекулярную массу бычьего КМ-7-иммунореактивного материала в экстрактах плазмы крови детей первого года жизни оценивали методом гель-фильтрационной ВЭЖХ, как описано Kost et al., (2009). Колонка Protein Pak 60 7.8x300 мм, элюция 0.7 мл/мин, детекция при 226 нм. Препаратами сравнения и стандартами служили гексапептид даларгин, бета-казеин быка и бычий КМ-7 (Sigma, США).

Обратнофазная ВЭЖХ. Оценку соответствия времени удержания КМ-7-иммунореактивного материала экстрактов плазмы крови детей реальному бычьему КМ-7 проводили методом обратно-фазной ВЭЖХ, как описано Kost et al., (2009). Колонка ProntoSIL-120-5-C18 (2.0x75 мм). Элюция в градиенте ацетонитрила (0-60%) в 0.1% ТФУ, 0.2 мл/мин, детекция при 206 нм.

Радиорецепторный анализ (РРА)

Сродство КМ-7 человека к 5-НТ₂-серотониновым и D₂-дофаминовым рецепторам определяли *in vitro* по его конкуренции с 3Н-спипероном за связывание с рецепторами мембранной фракции фронтальной коры (5-НТ₂-рецепторы) и стриатума (D₂-рецепторы) головного мозга крыс как описано Sokolov et al., (2004). Отделение связавшейся и несвязавшейся метки проводили на харвестере Skatron (Швеция) на стекловолокнистых фильтрах GF-B (Whatman, США). Радиоактивность проб измеряли на счетчике "Mini-beta" (LKB-Wallac, Финляндия).

Концентрацию белка в инкубационной смеси определяли по методу Лоури с использованием реагентов фирмы «Sigma» (США) на спектрофотометре фирмы «Perkin-Elmer» (ФРГ).

Серотонин-индуцированная агрегация тромбоцитов

Способность КМ-7 человека и быка влиять на серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека изучали *ex vivo* на лазерном оптическом агрегометре «Биола» (Россия) по методу Борна-О'Браена, как описано (Соколов и др., 2005). Спонтанная и индуцированная агрегация определялась при 37°C. В качестве индуктора использовали серотонин (Sigma) в конечной концентрации 10 мкМ. Кетансерин (0,01-1 мкМ) или исследуемые пептиды (0.1-100 мкМ) добавляли в инкубационную среду за 2 минуты до введения серотонина. При обработке полученных результатов использовали программу Prism 3.0 (GraphPad, США).

Определение уровня микроальбуминурии

Уровень микроальбуминурии у детей с НДМП определяли как описано (Соколов и др., 2010) пирогаллоловым методом с помощью наборов фирмы «Вектор-бест» (Россия) на спектрофотометре «Ultrospec 1100» (Amersham, США) при длине волны 598 нм.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0 for Windows». Сравнение межгрупповых различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента, непараметрического критерия Манни-Уитни (U-test), а также дисперсионного анализа (one-way ANOVA). На графиках представлены средние значения с учетом стандартной ошибки среднего (Mean+SEM). При изучении гендерных отличий применяли факторный анализ. Для определения корреляционных связей параметрических данных использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона (r), непараметрических данных - коэффициент корреляций Спирмана (R).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. ЭНДОГЕННЫЕ ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ПМР ДЕТЕЙ

1.1 Зависимость скорости гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови

от возраста и пола

Среднее значение $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови новорождённых составило $2,21 \pm 0,05$ мин. У детей 1-12 месяцев жизни это значение было выше, чем у новорожденных ($p < 0,05$) и составило $2,37 \pm 0,05$ мин. У детей 7-12 лет этот параметр достигал значений $2,54 \pm 0,13$ мин и был выше, чем у новорождённых и детей 1-12 месяцев жизни. При этом значения $t_{1/2}$ лей-энкефалина во всех 3 исследованных группах детей оказались ниже, чем у взрослых доноров ($3,10 \pm 0,05$ мин, $p < 0,01$).

Таким образом, впервые показано, что активность ЭДФ и, следовательно, время функционирования эндогенных опиоидных пептидов в сыворотке крови человека зависит от возраста. Скорость гидролиза лей-энкефалина максимальна у новорожденных, и постепенно снижается, достигая в возрасте 35-ти лет минимальных значений (рис.1).

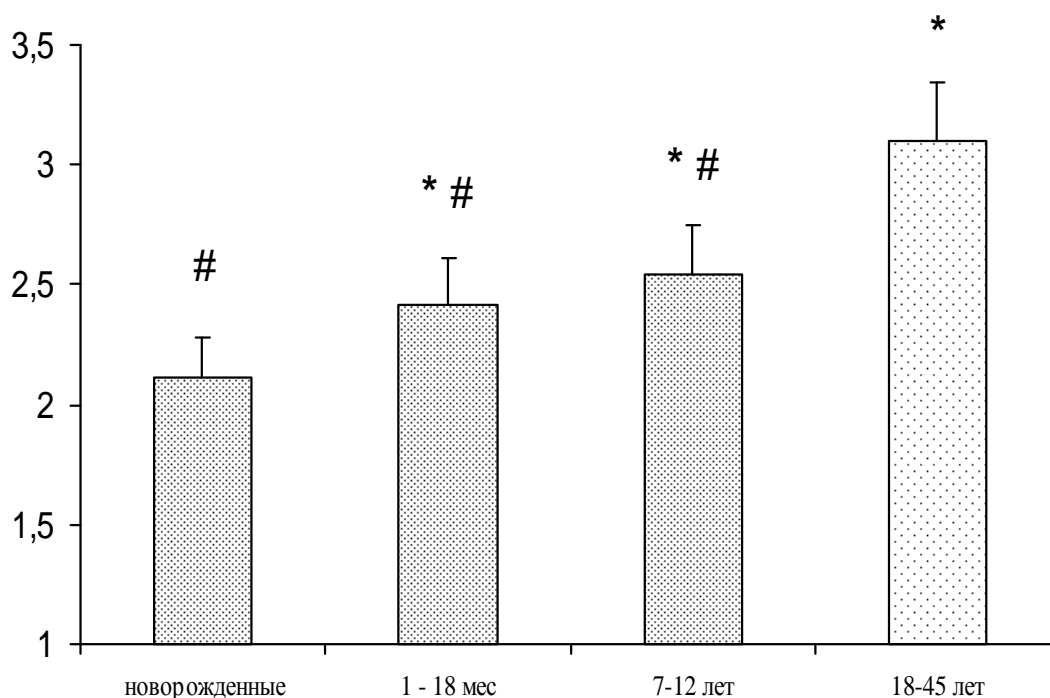


Рис.1 Зависимость времени полужизни лей-энкефалина в сыворотке крови (мин) от возраста человека. * - отличие от новорожденных, # - отличие от взрослых, $p < 0.05$

Высокую скорость гидролиза лей-энкефалина в крови новорождённых и грудных детей можно объяснить более высоким уровнем метаболизма, необходимым для интен-

сивного развития в этот период. Действительно, низкое содержание таких регуляторных пептидов, как бета-эндорфин и субстанция P, в ликворе маленьких детей и его постепенное повышение с возрастом было обнаружено в работе Nagamitsu et al. (1998). Постепенное возрастное падение активности пептидаз в крови людей можно объяснить как общим снижением обменных процессов (Хавинсон и др., 2001), так и возможным увеличением концентрации эндогенных ингибиторов ферментных систем, энкефалиндеградирующей, в частности (Marini et al., 1999; Соколов и др., 2000).

Исследования Marini et al., (1999) обнаружили зависимость времени полужизни лей-энкефалина в плазме крови взрослых от пола: у женщин это значение достоверно выше, чем у мужчин. Нами установлено, что $t_{1/2}$ лей-энкефалина в крови мальчиков и девочек в периоде новорождённости не отличаются и составляют $2,24 \pm 0,07$ и $2,20 \pm 0,08$ мин, соответственно. В отличие от новорождённых, в группе детей 1-12 месяцев отличия уже наблюдаются - $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови девочек составило $2,51 \pm 0,08$ мин. и было выше, чем у мальчиков - $2,26 \pm 0,06$ мин ($p < 0,01$). Гендерные отличия в активности ЭДФ обнаружены нами и в младшем школьном возрасте: $2,65 \pm 0,09$ и $2,46 \pm 0,05$ мин, у девочек и мальчиков, соответственно, $p < 0,05$ (табл.12).

Таким образом, гендерные отличия в активности ЭДФ начинают, по-видимому, проявляться уже на первом году жизни. Полученные результаты позволяют предположить, что не только половые гормоны, но и опиоидные пептиды принимают участие в процессах половой дифференцировки ЦНС.

Табл.1. Гендерные различия скорости распада лей-энкефалина в сыворотке крови людей разного возраста

Новорождённые (1 месяц жизни) n=11	мальчики = девочки p = 0.4
Грудные (1-12 месяц) n=57	мальчики > девочки p < 0.05
Младшие школьники (7-12 лет) n=11	мальчики > девочки p < 0.05
Взрослые (18-45 лет) (данные Marini et al., 2001)	мужчины > женщины p < 0.05

1.2 Скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови и показатели темперамента детей первого года жизни

Предполагается, что активность различных нейрхимических систем организма, в том числе опиоидной, зависит от врожденных, конституциональных особенностей человека, таких как темперамент. Темперамент ребенка является важным фактором, определяющим его способ реагирования на окружающий мир, это «стиль поведения, отличающийся от содержания и успешности деятельности, с одной стороны, и от мотивации, с другой» (Thomas, Chess, 1977).

Обследовано 20 здоровых детей (10 мальчиков и 10 девочек). Показатели характеристик темперамента обследованных не отличались от референтных величин здоровых детей первого года жизни московской популяции. В результате обнаружена положительная корреляция ($p < 0,05$) времени полужизни лей-энкефалина в сыворотке крови детей с такими характеристиками темперамента как «Активность», «Приятие», «Интенсивность» и «Порог» (табл.2).

Таблица 2. Связь между показателями темперамента детей первого года жизни и $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови ($n=20$).

Показатель темперамента и его краткая характеристика		Коэффициент корреляции Спирмана
Активность	Степень физической и двигательной активности	$R = 0,47, *$ $p = 0,04$
Регулярность	Регулярность периодов сна, бодрствования, режим кормлений	$R = -0,07,$ $p = 0,78$
Приятие	Первоначальная реакция на новые внешние стимулы	$R = 0,48, *$ $p = 0,03$
Адаптивность	Легкость, с которой ребенок приспосабливается к изменениям среды	$R = 0,16,$ $p = 0,49$
Интенсивность	Сила реакции, вне зависимости от ее качества и направления	$R = 0,44, *$ $p = 0,05$
Настроение	Общее соотношение поведенческих реакций в течение суток	$R = 0,17,$ $p = 0,47$
Настойчивость	Длительность какой-либо деятельности и способность ее продолжать вопреки помехам	$R = -0,07,$ $p = 0,77$
Отвлекаемость	Легкость изменения поведения в ответ на новые ситуации	$R = 0,29,$ $p = 0,22$
Порог	Минимальная сила внешних воздействий, необходимая для реакции ребенка	$R = 0,56, *$ $p = 0,01$

Показано, что чем выше время полужизни лей-энкефалина в сыворотке крови, тем выше степень физической активности и больше движений совершает ребенок во время кормлений, пеленаний, переодеваний, игр и т.п. Положительная корреляция между «Активностью» и $t_{1/2}$ соответствует экспериментальным данным о способности опиоидных пептидов влиять на двигательную активность (Vaamonde et al., 1992; Perrine et al., 2006).

«Приятие» в определенной степени соответствует экстравертированности у взрослых. Нами обнаружено, что чем ниже активность ЭДФ, тем доброжелательнее и спокойнее реагируют дети на новые стимулы.

«Порог» - это уровень интенсивности внешних воздействий, необходимый чтобы вызвать какую-либо реакцию у ребенка на сенсорную стимуляцию. Корреляция показателей шкалы «Порог» с $t_{1/2}$ лей-энкефалина подтверждает данные о способности опиоидов влиять не только на ноцицепцию, но и на реактивность нервной системы в целом (Vaamonde et al., 1992).

Интересно, что никаких достоверных корреляционных связей между характеристиками темперамента и уровнем ПМР детей не было выявлено. Это еще раз подтверждает данные литературы о том, что темперамент не отражает уровень развития психики и моторики ребенка, а отражает генетически-заданные особенности поведения детей, подверженные при этом несомненному влиянию внешней среды (Matheny, 1984; Кельмансон, 2000).

1.3 Влияние вида вскармливания на скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови детей первого года жизни

Вопрос о влиянии характера вскармливания на формирование и особенности функционирования ОС практически не изучен. Нами впервые выявлена зависимость между активностью ЭДФ в сыворотке крови детей первого года жизни и видом вскармливания. У детей на естественном вскармливании $t_{1/2}$ лей-энкефалина ниже, чем на искусственном ($2,15 \pm 0,07$ мин. и $2,48 \pm 0,06$ мин., соответственно $p < 0,01$) (рис.3). Снижение скорости гидролиза пептида при искусственном вскармливании можно объяснить влиянием экзогенных веществ-ингибиторов ферментов - известно, например, что бычий казоморфин-9 способен ингибировать один из ЭДФ – ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) (Fitzgerald et al., 2004). С другой стороны, поскольку ранний перевод на искусственное вскармливание, по мнению ряда авторов, является для ребенка метаболическим стрессом (Воронцов и др., 1997, 1998), то увеличение $t_{1/2}$ лей-энкефалина может быть также отражением компенсаторной роли ОС в условиях данного стресса. Данное пред-

положение подтвердилось в последующем анализе изменений энкефалиназной активности при стресс-индуцированных нарушениях ПМР у детей разных возрастных групп.

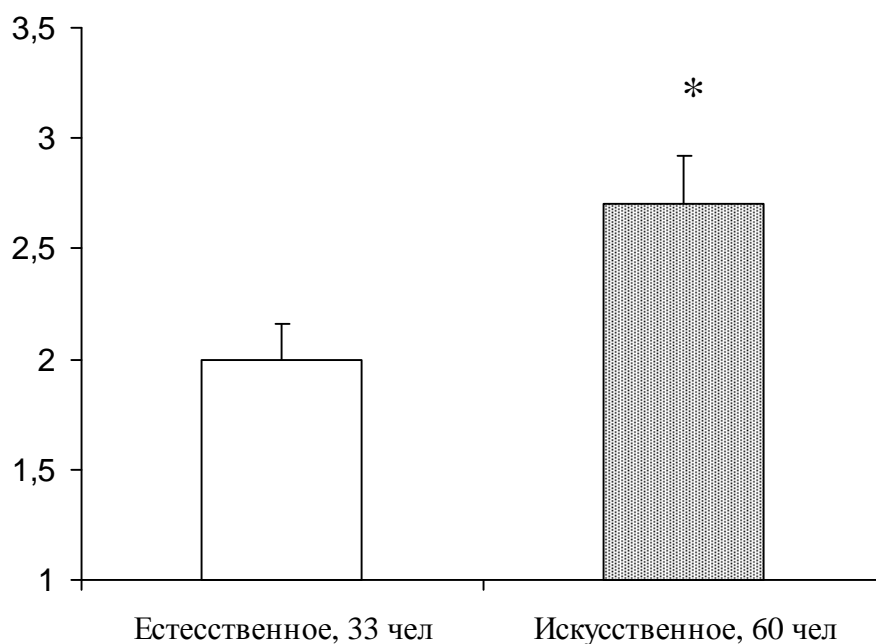


Рис.2 T1/2 лей-энкефалина в сыворотке крови детей, находящихся на разных видах вскармливания. * - $p < 0,01$.

1.4 Скорость гидролиза опиоидных пептидов в крови детей первого года жизни при нарушениях развития

1.4.1 Влияние ГИП ЦНС на активность ЭДФ у новорождённых

Гипоксически-ишемическое поражение ЦНС – одно из распространенных причин нарушения нормального развития детей первого года жизни. Для оценки роли ОС при данной патологии мы исследовали активность ЭДФ у новорожденных с ГИП ЦНС в зависимости от тяжести состояния. Установлено, что у детей с ГИП ЦНС, находившихся в тяжелом состоянии (выраженное угнетение рефлексов, брадикардия, мышечная гипотония), значение $t_{1/2}$ составило $2,48 \pm 0,17$ мин, что достоверно выше ($p < 0,05$) значений у новорожденных в состоянии легкой и средней тяжести ($2,12 \pm 0,09$ мин) и у здорового контроля ($2,21 \pm 0,05$ мин). Увеличение этого показателя у новорождённых с тяжелой церебральной ишемией, перенесших тяжелую гипоксию в родах, можно расценивать как адаптационную реакцию ОС, связанную, возможно, с выбросом в кровь эндогенных ингибиторов пептидаз (Yamamoto et al., 2002).

1.4.2 Влияние задержки внутриутробного развития (ЗВУР) на активность ЭДФ

у доношенных детей первого года жизни

Нарушение роста и развития у новорождённых могут возникать на различных этапах внутриутробной жизни под влиянием таких неблагоприятных факторов, как тяжёлый ранний токсикоз, гестоз, плацентарная недостаточность и др. Следствием этого является рождение детей с ЗВУР (дети рождены в срок, но со сниженной массой тела). У детей с ЗВУР чаще встречаются отклонения психомоторного развития (Шабалов, 1997; Дементьева, 2000). Более того, перинатальная смертность доношенных детей с ЗВУР в 3-8 раз выше, чем у детей с нормальной массой при рождении (Дементьева, 2000). Предполагается, что возникающие пренатально изменения в формирующейся нейроэндокринной системе ребенка сохраняются на протяжении первого года жизни, а также определяют особенности его адаптации в дальнейшей жизни. Так, по данным Дементьевой и др., (2004), у детей с ЗВУР наблюдается отставание в физическом развитии и чаще встречаются эндокринные заболевания и дисфункции на протяжении всей жизни. Поскольку отдаленное влияние ЗВУР на функционирование ОС у детей ранее не изучалось, мы сравнили показатели активности ЭДФ доношенных детей первого года жизни в зависимости от наличия ЗВУР при рождении. Показано, что у здоровых доношенных новорожденных с массой тела, соответствующей гестационному возрасту, время полужизни лей-энкефалина ниже чем у доношенных детей, родившихся с ЗВУР по гипотрофическому типу, $t_{1/2}$ составило $2,34 \pm 0,06$ мин и $2,70 \pm 0,10$ мин, соответственно, $p < 0,05$ (табл.3). Повышение $t_{1/2}$ лей-энкефалина у детей с ЗВУР, можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции ОС на стресс, который плод испытывал внутриутробно.

1.4.3 Зависимость активности ЭДФ от гармоничности физического развития и уровня

ПМР детей первого года жизни

Гармоничное физическое развитие является одним из основных критериев здоровья ребенка. Оно отражает не только динамику увеличения размеров и массы тела, но и сопровождающие эти процессы качественные изменения функциональной активности организма, темпы биологического созревания. Предполагается, что дети с отклонениями в физическом развитии имеют особенности обмена веществ, активности ферментативных систем (Неудахин, 1992; Мухина, Конь, 2010). У детей первого года жизни среди отклонений физического развития наиболее часто встречается гипотрофия. Многие сто-

роны патогенеза неблагоприятного воздействия гипотрофии на организм ребенка, в том числе особенности нейроэндокринной регуляции этого процесса не изучены.

Некоторые авторы (Неудахин, 1992) рассматривают гипотрофию как проявление хронической стрессовой реакции. Нами обнаружено, что у детей с гармоничным физическим развитием $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови было ниже, чем у детей, имеющих негармоничное физическое развитие за счет дефицита массы тела (гипотрофии) и составило $2,29 \pm 0,05$ мин и $2,67 \pm 0,08$ мин., соответственно, $p < 0,05$ (табл.3).

Таблица 3. $T_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови детей первого года жизни при различных нарушениях развития

	Патология	Здоровый контроль
Тяжелое ГИП ЦНС новорождённых	2.48 ± 0.17 * n=5	2.21 ± 0.05 n=11
Задержка внутриутробного развития (ЗВУР)	2.70 ± 0.1 * n=10	2.34 ± 0.06 n=68
Негармоничное физическое развитие (Гипотрофия)	2.67 ± 0.08 * n=32	2.29 ± 0.05 n=61
Задержка ПМР (у доношенных детей)	2.83 ± 0.2 * n=12	2.39 ± 0.08 n=47

* - отличие от нормы, $p < 0,05$

Статистически значимые различия в выделенных группах сохраняются на разных видах вскармливания, а также у детей разного пола. Таким образом, впервые показано, что при негармоничном физическом развитии уровень метаболизма опиоидных пептидов снижен.

Психомоторное развитие ребенка представляет собой сложный процесс. В его основе лежит генетическая программа, которая реализуется в условиях постоянной смены факторов окружающей среды. Проведенный нами анализ данных по всей генеральной выборке не выявил корреляционных связей между скоростью распада энкефалинов и уровнем ПМР детей, выраженным в баллах. Не выявлено статистически значимых различий $t_{1/2}$ в выделенных по психомоторному развитию группах детей (возрастная норма, группа риска, задержка ПМР). Интересно влияние такого фактора как доношен-

ность/недоношенность на функционирование ОС при задержке ПМР у детей на первом году их жизни. Оказалось, что у доношенных детей при задержке ПМР на первом году жизни активность ЭДФ достоверно снижена по сравнению с нормой ПМР, то есть наличие протективная реакция ОС, приводящая к увеличению времени жизни опиоидных пептидов в крови. У детей, родившихся недоношенными, при задержке ПМР на первом году жизни данная реакция ОС не происходит, то есть существует некий отсроченный эффект стресса преждевременных родов на функционирование ОС ребенка.

Обобщая полученную информацию, можно сделать заключение, что нормальное сбалансированное развитие детей первого года жизни характеризуется высоким уровнем активности ЭДФ, а любое нарушение развития, будь-то задержка внутриутробного развития (ЗВУР), гипоксически-ишемическое поражение ЦНС, задержка ПМР или гипотрофия (негармоничное физическое развитие) – сопровождается снижением активности ЭДФ в крови. Следует отметить, что снижение скорости гидролиза опиоидов зафиксирована также у детей, испытывающих метаболический стресс искусственного вскармливания (рис.2). Интересно, что аналогичная реакция ОС наблюдается у взрослых людей при тяжелых соматических травмах (переломах) (Babst et al., 1999).

Можно предположить, что падение активности энкефалиназ при данных патологиях является общей, универсальной реакцией опиоидной системы человека, направленной на поддержание гомеостаза, выведенного из равновесия. Молекулярный механизм снижения энкефалиназной активности может быть связан со стресс-индуцированным выбросом значительного количества опиоидных и других регуляторных пептидов (по принципу «ингибирования субстратом») и/или низкомолекулярных эндогенных ингибиторов ЭДФ, существование которых в крови взрослого человека установлено Marini et al., (1990, 1996, 2000).

Учитывая, что эндогенные опиоидные пептиды обладают адаптогенной, стресс-протективной активностью, участвуют в регуляции эмоциональной сферы, влияют на обучение и память (Olson et al., 1990; Ашмарин, Каразеева, 1996; Зозуля и др., 1999), представленные данные позволяют предположить их несомненное участие во всестороннем развитии ребенка уже в раннем постнатальном периоде. При этом активность ЭДФ в сыворотке крови отражает состояние ОС ребенка, ее адаптационную реакцию при нарушениях развития. Для подтверждения данной гипотезы мы исследовали реакцию ОС у детей 7-12 лет при хроническим стресс-индуцированном нарушении развития, связанным с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря (НДМП).

1.5. Скорость гидролиза лей-энкефалина в крови детей 7-12 лет с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря (НДМП)

Детский организм чрезвычайно резко реагирует на неблагоприятные внешние влияния в переходные, «узловые» возрастные периоды. Одним из таких периодов является младший школьный возраст. Физиологическая роль ОС детей при стресс-индуцированных расстройствах, свойственных данному возрасту, до сих пор малоизученна. Поэтому мы исследовали взаимосвязь активности ЭДФ с клинико-психологическими характеристиками детей с НДМП, своеобразной моделью стрессового расстройства центральной и вегетативной нервной систем, не связанного с серьезной органической патологией.

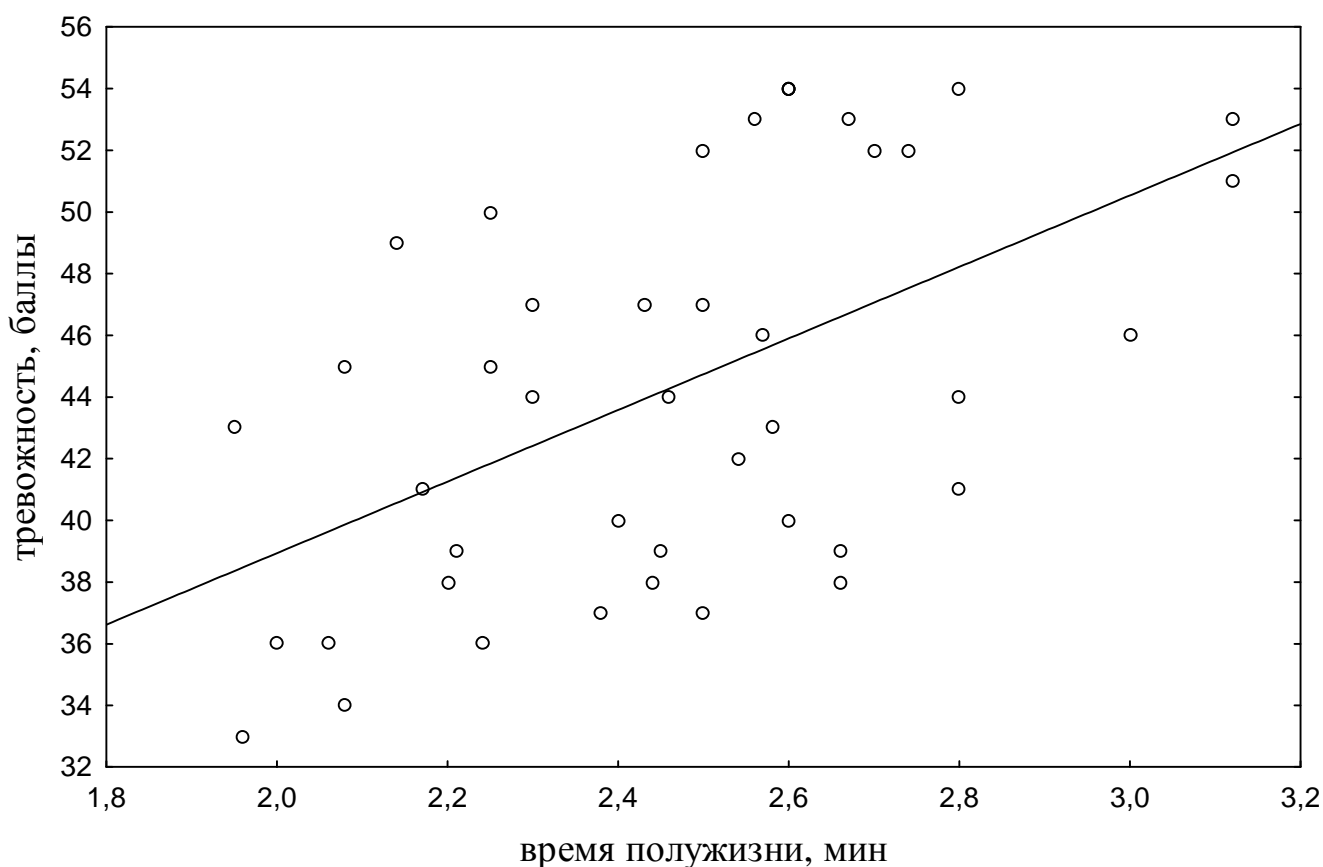


Рис.4 Взаимосвязь $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови и уровня тревожности у детей с НДМП. $R=0,731$, * - $p<0,01$.

$T_{1/2}$ лей-энкефалина в крови у детей с НДМП не отличалось от группы контроля ($2,46\pm 0,05$ мин и $2,54\pm 0,13$ мин, соответственно). Активность ЭДФ у детей с очень высокой тревожностью была ниже, чем у детей с нормальным уровнем тревожности ($2,65\pm 0,12$ мин и $2,34\pm 0,07$ мин, соответственно $p<0,05$). Уровень тревожности детей с НДМП прямо коррелировал с $t_{1/2}$ лей-энкефалина, $R=0,731$, $p<0,01$ (рис.4). Ранее нами было показана аналогичная взаимосвязь скорости гидролиза лей-

энкефалина в крови и уровне тревожности у взрослых людей при стрессе (Зозуля и др. 2006).

Таким образом, впервые показано, что реакция ОС на стресс у детей 7-12 лет сходна с таковой у взрослых и также проявляется в увеличении времени циркулирования опиоидных пептидов в крови при росте уровня тревожности.

При исследовании психологических особенностей детей с НДМП с дневным недержанием мочи (n=33), установлена обратная зависимость между величиной $t_{1/2}$ и замкнутостью (отгороженностью) по тесту Рене Жиля ($R=-0,42$, $p<0,05$) (рис.5). У детей, страдающих энурезом (ночное недержание мочи, n=23) и комбинированным расстройством мочеиспускания (энурез + дневное недержание, n=9) время полужизни лей-энкефалина в крови прямо коррелирует с «общительностью» и «отношением к сверстникам» ($R=0,48$ и $R=0,49$, $p<0,01$). То есть, чем медленнее идет гидролиз энкефалинов в крови, тем более общителен и открыт ребенок, даже в условиях болезни.

Интересно, что аналогичная взаимосвязь скорости распада энкефалинов в крови и уровня экстравертированности личности была ранее обнаружена нами у взрослых, причем как в норме (Соколов и др., 2001), так и при тревожно-фобических расстройствах (Зозуля и др. 2006).

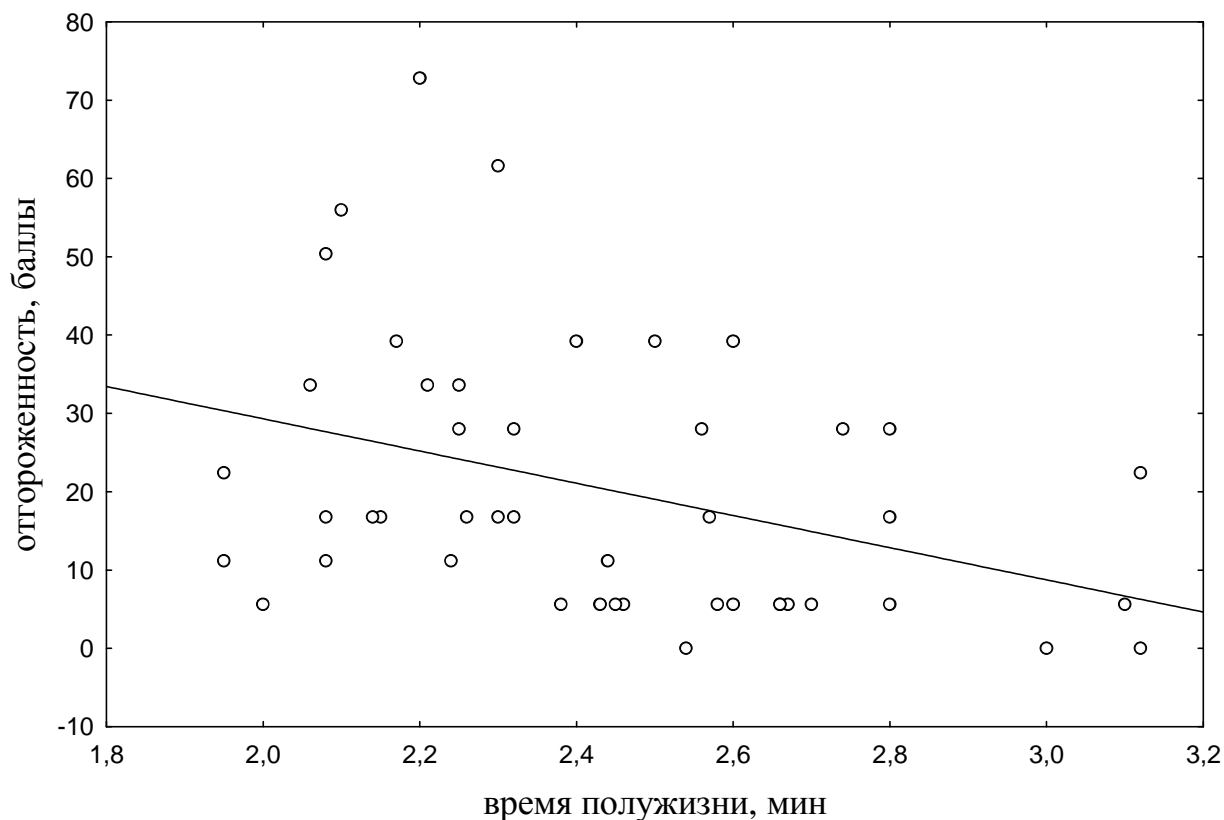


Рис.5 Взаимосвязь $t_{1/2}$ лей-энкефалина и замкнутости (отгороженности) у детей с недержанием мочи, $R = -0,42$, $p<0,05$, $n=32$.

На следующем этапе была выявлена зависимость $t_{1/2}$ энкефалина от анозогнозии (отношению к болезни). По данному параметру оценивают степень психологической адаптации ребенка к стрессовым условиям данного заболевания. Оказалось, что у детей, отвергающих болезнь (вариант своеобразной адаптации к стрессу), $t_{1/2}$ энкефалина в сыворотке крови был выше, чем у ее признающих, $n=11$; $2,69 \pm 0,07$ мин и $n=38$; $2,40 \pm 0,04$ мин, соответственно, $p < 0,05$.

Необходимо отметить, что сходная реакция ОС отмечалась нами ранее у взрослых больных с тревожно-фобическими расстройствами - при их адаптации к стрессовым условиям скорость гидролиза лей-энкефалина в крови также падала (Зозуля и др., 2006). Об участии ОС в адаптации детей к стрессу говорит также тот факт, что в отдельной группе больных НДМП с таким отягощающим симптомом, как дневное недержание мочи, выявлена обратная зависимость между величиной $t_{1/2}$ и оценкой по шкале «Маленький неудачник» ($R = -0,45$, $p < 0,05$).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что показатели ОС детей 7-12 лет связаны с личностными характеристиками ребенка, а ее реакция на стресс аналогична взрослой.

На основании представленных результатов можно заключить, что эндогенные опиоидные пептиды действительно задействованы в механизмах психомоторного развития детей и их адаптации к стрессу, причем как в первые годы жизни, так и в более старшем возрасте. На основании вышеизложенного может создаться впечатление, будто физиологическое действие опиоидных пептидов всегда благотворно и однозначно полезно для развивающегося организма ребенка. Так ли это на самом деле? Могут ли опиоидные пептиды быть причиной задержки развития? Существует гипотеза о возможном патологическом влиянии на ребенка экзогенных опиоидных пептидов пищевого происхождения. В ней предполагается, что при нарушении метаболизма экзогенных опиоидных пептидов, процессов их деградации и выведения из организма, данные вещества могут негативно влиять на созревание различных систем детского организма, в частности ЦНС, и быть причиной таких тяжелых патологий, как аутизм. Проверке гипотезы о возможном негативном влиянии опиоидных пептидов пищевого происхождения (на примере казоморфинов) была посвящена вторая часть нашего исследования.

2. ЭКЗОГЕННЫЕ ОПИОИДНЫЕ ПЕПТИДЫ И ПМР ДЕТЕЙ

Казоморфины (КМ), продукты гидролиза белков-казеинов молока, считаются возможными экзогенными биорегуляторами психомоторного развития детей. Экспериментальные работы, проведенные на детенышах млекопитающих, подтверждают эту предположение (Дубынин и др., 2000-2009), но полная экстраполяция экспериментальных данных на людей не совсем корректна. Непосредственное влияние КМ на развитие детей, прежде всего грудного возраста, до сих пор не установлено. Более того, само существование этих пептидов в крови детей до сих пор не было доказано. Поэтому мы исследовали содержание КМ-7 быка и человека в плазме крови детей первого года жизни, попытались выявить его возможную взаимосвязь с уровнем ПМР, а также изучили содержание КМ-7 быка в моче детей 5-7 лет в норме и при аутистических расстройствах.

2.1. Разработка радиоиммунного и иммуноферментного методов определения КМ-7

В процессе исследования был разработан высокочувствительный метод радиоиммунного и иммуноферментного анализа содержания ирКМ-7 быка и человека в биологических жидкостях. Чувствительность ИФА к КМ-7 быка составила 20 фмоль. Чувствительность РИА составила: для КМ-7 быка: 6 фмоль (10 пг), КМ-7 человека: 25 фмоль (40 пг), она была на порядок выше, чем у масс-спектрометрических методов определения КМ (Dettmer et al., 2007) и сравнима с методом Singh et al. (1989), исследовавшим ирКМ-7 быка у щенков (20 пг). Далее с помощью обратно-фазной и гель-фильтрационной ВЭЖХ было доказано соответствие молекулярной массы и других физико-химических свойств определяемого в РИА и ИФА иммунореактивного материала показателям КМ-7 быка. Отработанные РИА и ИФА были использованы в дальнейшей работе.

2.2 Казоморфины и ПМР детей грудного возраста

2.2.1 Содержание ирКМ-7 быка в плазме крови детей первого года жизни

Впервые показано, что в крови детей, находящихся на вскармливании искусственной молочной смесью на основе коровьего молока, циркулируют вещества с иммунореактивностью КМ-7 быка. При этом, базовый уровень ирКМ-7 быка в плазме крови грудных детей на искусственном вскармливании в течение всего первого года жизни достоверно не изменяется. Показано, что через три часа после кормления адаптированной молочной смесью у детей 1-3 месяцев жизни ирКМ-7 быка возрастает от 67 ± 19 до 146 ± 34

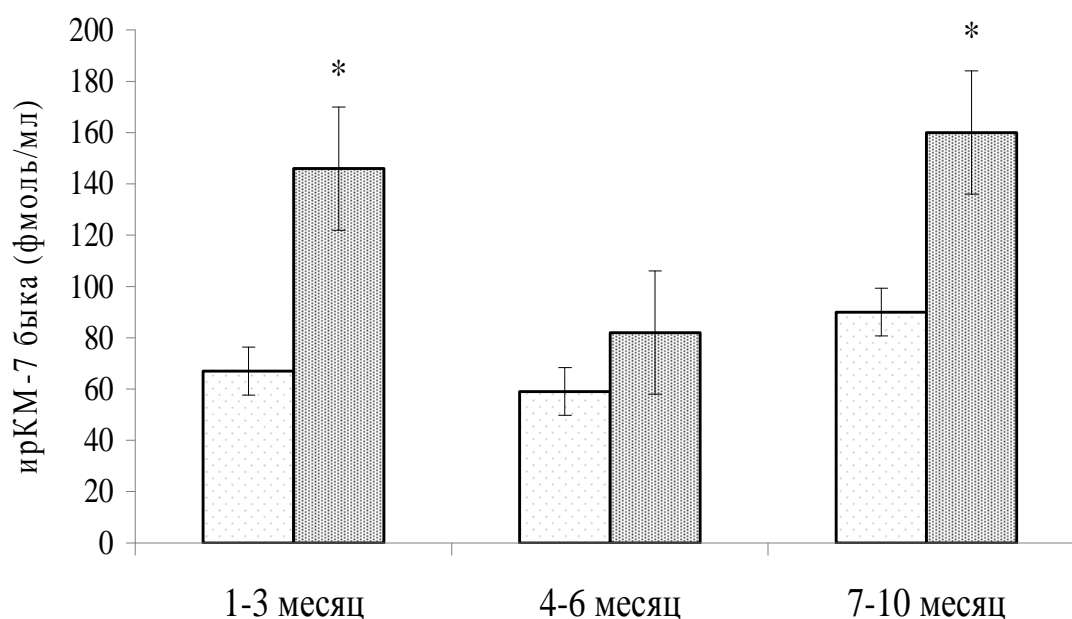


Рис.6 ИрKM-7 быка в плазме крови детей до и после кормления адаптированной молочной смесью ($M \pm m$), * - результат кормления, $p < 0,05$.

фмоль/мл, $p < 0,05$, а у детей второго полугодия жизни статистически значимо ($p < 0,05$) возрастают от 90 ± 14 до 160 ± 29 фмоль/мл (рис.6). У детей 4-6 месяцев жизни средние значения ирKM-7 быка в плазме крови также увеличиваются, но не достоверно (с 52 ± 16 до 82 ± 29 фмоль/мл).

Таким образом, у детей на искусственном вскармливании после кормления адаптированной молочной смесью отмечен достоверный рост ирKM-7 быка как в первые три месяца жизни, так и старше 6 месяцев. Известно, что дети 6-12 месяцев получают молочные смеси с относительно большим содержанием белка, чем в первом полугодии. По-видимому, этот факт отражается на динамике показателя после кормления у детей старше 6 месяцев жизни при искусственном вскармливании.

2.2.2 Содержание ирKM-7 человека в плазме крови детей первого года жизни

Показано, что в крови детей, получающих женское молоко, постоянно циркулируют вещества, обладающие иммунореактивностью KM-7 человека (ирKM-7). В пробах, взятых до кормления после 6 часового ночного перерыва, «базовый» уровень ирKM-7 у детей от 1 до 3 месяцев жизни составил 208 ± 23 фмоль/мл и достоверно не отличался от детей 4-9 месяцев жизни - 197 ± 30 фмоль/мл. Через 3 часа после кормления грудным молоком, у детей 1-3 месяцев жизни ирKM-7 человека возрастает от 208 ± 23 фмоль/мл до 296 ± 56 фмоль/мл ($p < 0,05$), а у детей 4-9 месяцев достоверно не изменяется (рис.7).

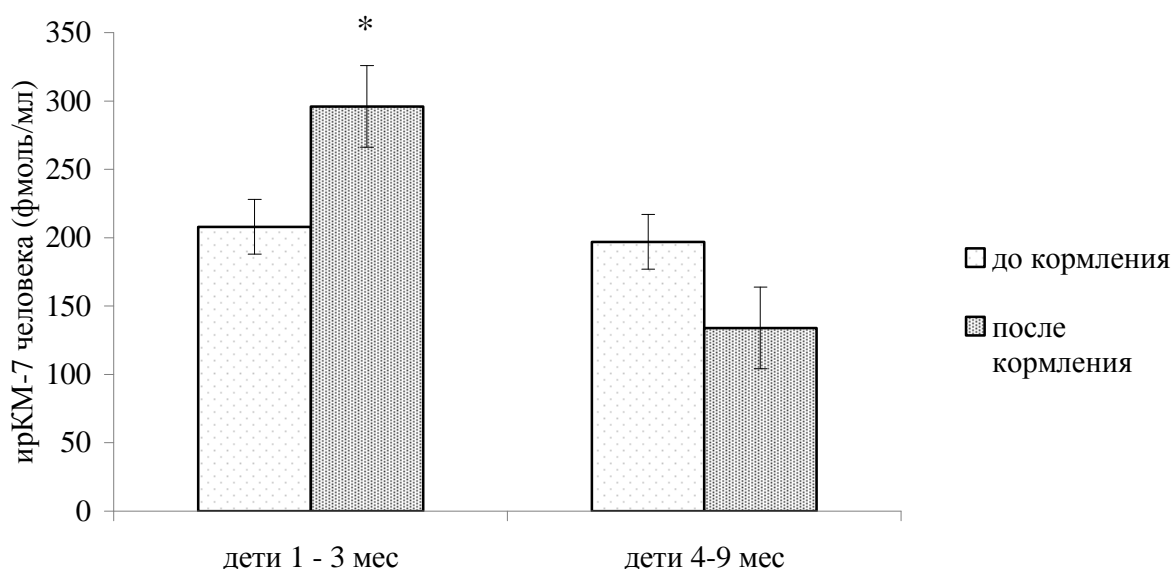


Рис. 7. ИрKM-7 человека в плазме крови детей до и после кормления грудным молоком, * - результат кормления, $p < 0,05$.

Повышение ирKM-7 человека в плазме крови через три часа после кормления наблюдается преимущественно у детей первых трех месяцев жизни. Можно предположить, что это связано с повышенной проницаемостью кишечного барьера, характерной для данного возраста (Стаченкова, 1997; Яцык, 2001; Андрусенко, 2005). При изучении базового уровня ирKM-7 человека в плазме крови детей в зависимости от разных вариантов грудного вскармливания (исключительно грудное, смешанное с преобладанием грудного молока, дополненное) различий в группах не выявлено. У детей, получающих исключительно грудное молоко, базовый уровень ирKM-7 составил 200 ± 32 фмоль/мл. У детей, получающих дополненное грудное и смешанное вскармливание с преобладанием грудного молока, - 204 ± 24 фмоль/мл. По-видимому, введение в рацион детей, получающих грудное молоко, небольшого количества адаптированных молочных смесей и блюд прикорма существенно не влияет на базовый уровень KM-7 человека.

При анализе индивидуальных спаренных показателей в выборке детей при естественном вскармливании (17 чел), выявлены как рост, так и снижение ирKM-7 человека через 3 часа после кормления. Можно предположить, что полученные отличия связаны с индивидуальной динамикой всасывания в ЖКТ и уровнем метаболизма KM в организме в целом. По-видимому, есть механизмы, регулирующие скорость поступления и выведения из организма пептидов. Возможно, одним из регуляторов (по принципу обратной связи) выступает непосредственно исходный уровень казеина или казоморфина. Так, в высоких концентрациях он замедляет процессы всасывания, что обуславливает сниже-

ние ирКМ-7 в плазме крови через 3 часа после кормления. И, напротив, недостаток КМ интенсифицирует процесс всасывания. Нельзя исключить также и различную динамику деградации КМ, связанную с индивидуальными особенностями функционирования пептидаз в организме детей.

2.2.3. ПМР детей первого года жизни и содержание КМ-7 человека и быка в крови

Известно, что КМ и их предшественники, могут преодолевать гематоэнцефалический барьер. Подтверждением могут служить данные об обнаружении ирКМ-8 в 19-ти различных зонах среднего мозга, моста и продолговатого мозга новорожденных детей (Pasi et al., 1993). Таким образом, взаимодействуя с различными структурами мозга, КМ могут оказывать определенное влияние на становление и развитие ЦНС. Для проверки этого предположения мы изучали возможную взаимосвязь между уровнем ПМР детей и содержанием ирКМ-7 человека или быка в их крови. В результате нами выявлена взаимосвязь между уровнем ПМР, состоянием мышечного тонуса и ирКМ-7 как человека, так и быка, причем связь между этими параметрами оказалась разнонаправленной. Так, при естественном вскармливании задержка темпов ПМР соответствует низкому базовому уровню ирКМ-7 человека. При искусственном вскармливании у детей с задержкой темпов психомоторного развития наблюдается повышенный базовый уровень ирКМ-7 быка. Аналогичная закономерность выявлена при анализе взаимосвязи состояния мышечного тонуса и базового уровня ирКМ-7 человека и быка в плазме крови детей, получающих грудь матери или адаптированную молочную смесь, соответственно. Дети с физиологическим мышечным тонусом, при грудном вскармливании, имеют самые высокие значения ирКМ-7 человека. У детей, получающих адаптированные молочные смеси, самые высокие значения ирКМ-7 быка в плазме крови выявлены при нарушении мышечного тонуса (сниженный, повышенный) (рис.9).

Обнаруженный разнонаправленный биологический эффект КМ-7 женского и коровьего молока, связан, по-видимому, с видоспецифичностью указанных пептидов. Так, первичная структура β -казеина, молекулы-предшественника казоморфинов, человека и коровы идентичны между собой всего на 47%. И, как следствие, аминокислотный состав молекулы казоморфина человека (Tyr-Pro-Phe-Val-Gly-Pro-Ile) и казоморфина быка (Tyr-Pro-Phe-Pro-Glu-Pro-Ile) различаются двумя аминокислотными остатками в четвертом и пятом положениях. Можно предположить, что структурное отличие молекул КМ-7 человека и быка, предполагает различие в спектре их биологической активности. Так, напри-

мер, КМ-7 человека обладает более низкой аффинностью к опиоидным рецепторам мозга крысы и подвздошной кишки морской свинки, чем КМ-7 быка (Koch et al., 1990). Кроме того, третий пролин в структуре бычьего КМ делает его молекулу более устойчивой к действию пептидаз и продлевает время функционирования в организме. Не вызывает сомнения тот факт, что КМ человека, поступающий с молоком матери, как и все прочие составляющие женского молока, более естественен и физиологичен для ребенка. По-видимому, важна именно первоначальная структура пептидов, поступающих с пищей. Попав в организм, экзогенные опиоидные пептиды производят значимый биологический эффект, и только затем разрушаются вплоть до отдельных аминокислот.

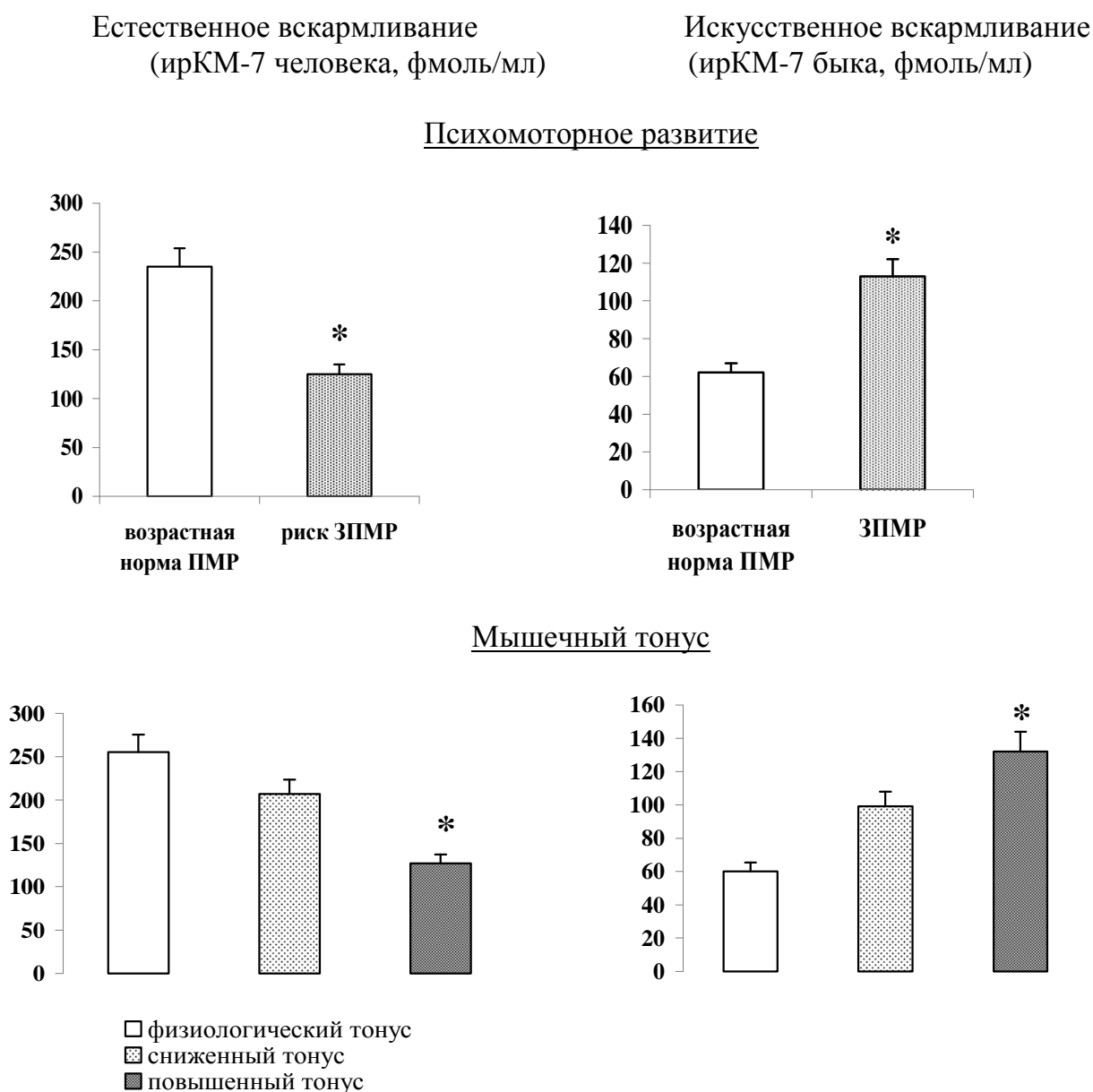


Рис.9 Психомоторное развитие, мышечный тонус и ирКМ-7 человека и быка в плазме крови у детей при разных видах вскармливания. * - отличия от нормы $p < 0,05$.

Не случайно высокий уровень КМ-7 человека у детей при естественном вскармливании соответствует хорошим темпам ПМР и физиологическому мышечному тону. И наоборот, низкие значения бычьего КМ-7 у детей при искусственном вскармливании сочетаются с нормальным уровнем ПМР и физиологическим мышечным тонусом, а высокие значения – с задержкой темпов ПМР. По-видимому, для гармоничного развития ребенка важно поступление регуляторных пептидов именно из женского молока. Влияние же бычьего КМ-7 на развитие ребенка неоднозначно. Анализ взаимосвязи оценки ПМР и ирКМ-7 быка в группе детей с ПМР в рамках возрастной нормы выявил прямую корреляционную связь ($R=0,43$; $p<0,05$). Кроме того, выявлена особенность динамики ирКМ-7 быка в плазме крови у детей с различным ПМР. Оказалось, что через 3 часа после кормления этот параметр достоверно повышается только в группе детей с нормальным ПМР, причем значения базового уровня в этой группе остаются самыми низкими. У детей с риском и задержками темпов ПМР после кормления ирКМ-7 быка достоверно не изменяется и остается на прежнем более высоком уровне по сравнению с нормой (рис.10).

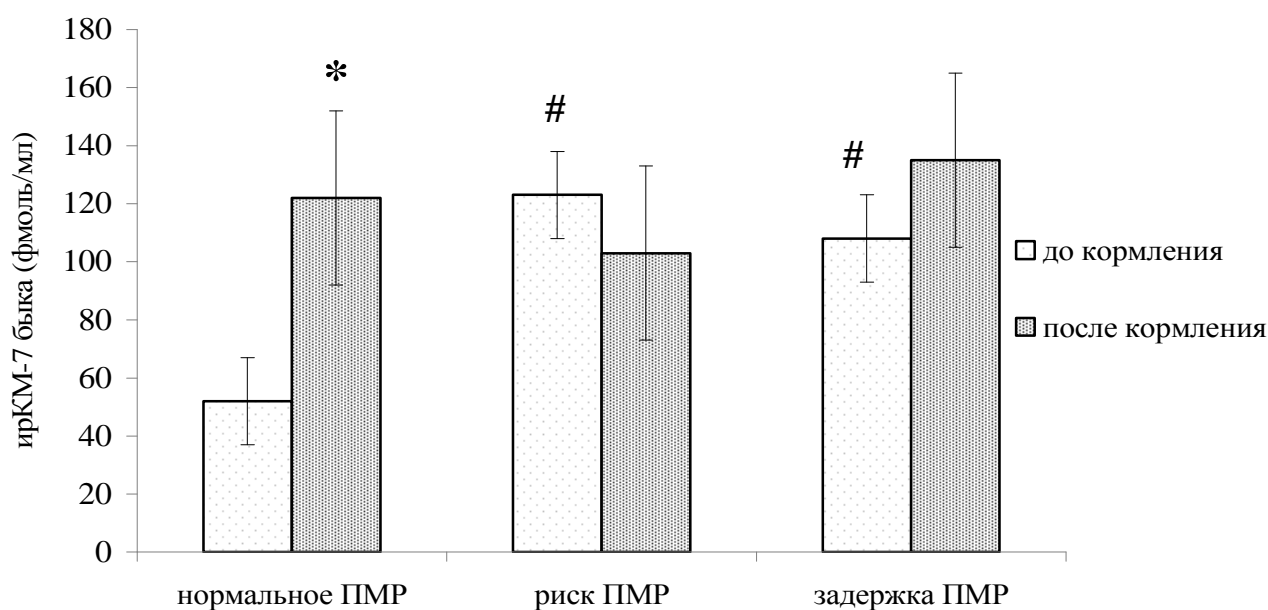


Рис.10. ИрКМ-7 быка в плазме крови детей из разных групп ПМР до и после кормления адаптированной молочной смесью, * - результат кормления, $p < 0,05$.

- отличие базового уровня от показателя детей с нормальным ПМР, $p < 0,05$.

Складывается впечатление, что высокий базовый уровень бычьего КМ у детей с риском и задержкой темпов ПМР обусловлен недостаточно слаженной системой катаболизма и выведения изучаемого пептида. Напротив, при нормально функционирующей

системе выведения, поступление в организм ребенка экзогенных опиоидных пептидов (даже в повышенном количестве) не приводит к нарушению ПМР.

2.3 Содержание КМ-7 быка в моче детей с аутистическими расстройствами

Одной из серьезных патологий ПМР являются аутистические расстройства, связанные с расстройствами речи, моторики и приводящими к социальной дезадаптации (Тиганов, 2005). Наряду с несколькими теориями возникновения аутизма, существует «опиоидная теория», объясняющая патогенез заболевания влиянием опиоидных пептидов пищевого происхождения (Panksepp, 1979). Повышенное содержание пептидов, в том числе КМ, в крови и моче детей с аутизмом подтверждено методом ВЭЖХ (Reichelt et al., 1981; Shattock, Whiteley. 2002). Для подтверждения данной теории более специфичным способом, мы разработали метод иммуноферментного определения КМ-7 быка в экстрактах мочи и применили его в пилотном скрининге 20 детей 4-7 лет – 10 здоровых и 10 с аутистическими расстройствами. Абсолютно неожиданным явилось наличие в моче здоровых детей бычьего КМ-7. По-видимому, в норме сквозь слизистую ЖКТ могут проходить не только ди- и трипептиды, но и несколько более крупные пептидные молекулы. Содержание бычьего КМ-7 в моче больных составила 91 ± 10 пг/мл и была достоверно выше, чем у здоровых детей (58 ± 7 пг/мл). В группе больных более высокий уровень КМ-7 отмечался у детей с детским аутизмом (синдром Каннера), чем у детей с синдромом Аспергера: 104 ± 10 и 75 ± 18 пг/мл соответственно, $p < 0.05$.

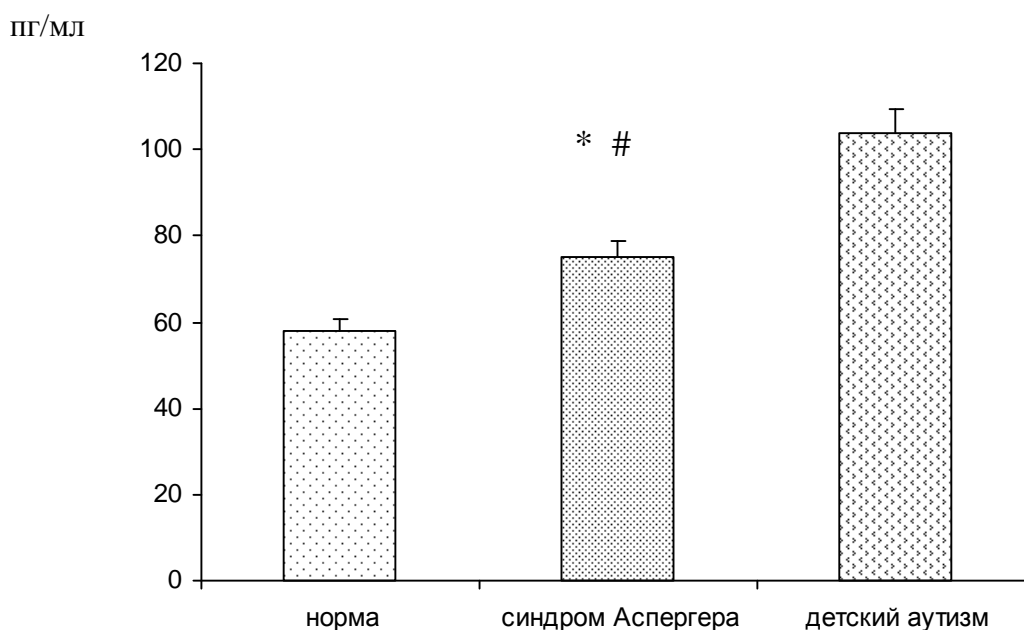


Рис.11 Содержание бычьего КМ-7 в моче детей в норме и при аутизме.

* - отличие от нормы, $p < 0.05$, # - отличие от детского аутизма, $p < 0.05$

Итак, подтверждено повышенное содержание КМ-7 быка в моче детей с аутистическими расстройствами. Более того, нами обнаружена прямая корреляция между концентрацией бычьего КМ-7 и тяжестью заболевания, оцениваемой в баллах по CARS, $R = 0.85$, $p < 0,01$ (рис.12).

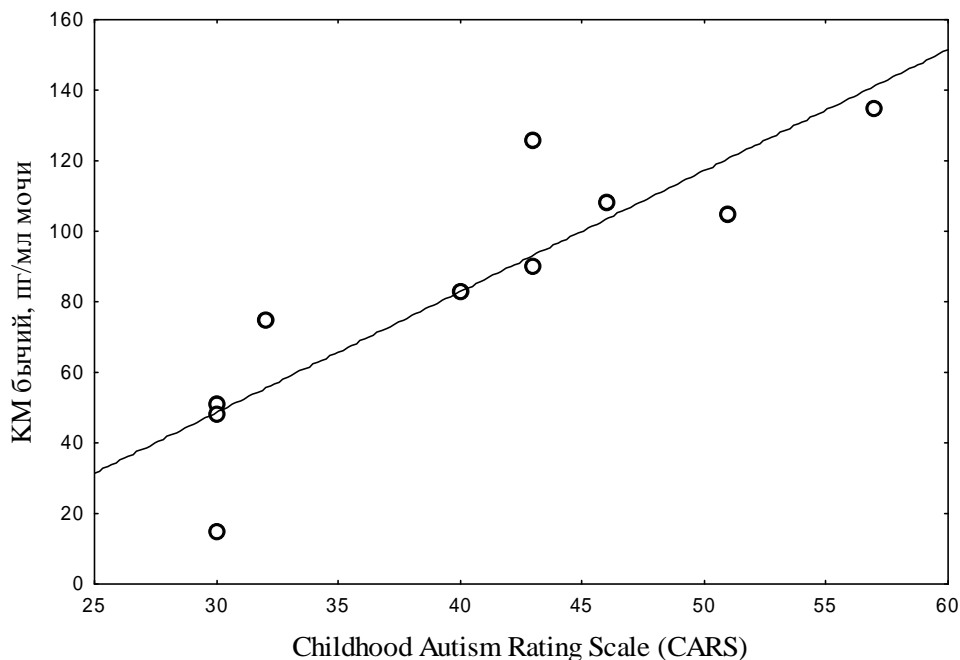


Рис.12 Взаимосвязь содержания ирКМ-7 быка в моче и тяжести аутистической патологии у детей. Коэффициент ранговых корреляций Спирмана $R = 0.85$, $p < 0,01$.

Таким образом, учитывая полученные данные, а также представленные выше данные о связи больших концентраций бычьего КМ-7 с нарушением ПМР в грудном возрасте, можно предположить, что повышенное содержание КМ-7 быка негативно влияет на организм ребенка и способствует нарушению в развитии, вплоть до появления аутистической патологии.

2.4 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

КАЗОМОРФИНОВ

2.4.1 Влияние КМ на активность ЭДФ сыворотки крови человека

В данной работе впервые продемонстрировано, что у детей, находящихся на искусственном вскармливании, скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови ниже, у детей, получающих грудное женское молоко. Это может быть связано с влиянием веществ-ингибиторов, содержащихся в искусственных смесях на основе коровьего мо-

лока. Действительно, бычий КМ-9, как и ряд других пептидов из белков коровьего молока, ингибирует один из ЭДФ – ангиотензинпревращающий фермент (Saito et al, 2000). Мы исследовали влияние бычьего КМ-7 на активность ЭДФ сыворотки крови детей первого года жизни и взрослых доноров. Установлено, что бычий КМ-7 ингибирует ЭДФ сыворотки крови как взрослых, так и детей первого года жизни – IC_{50} составило 350 мкМ и 1 мМ, соответственно (рис.13).

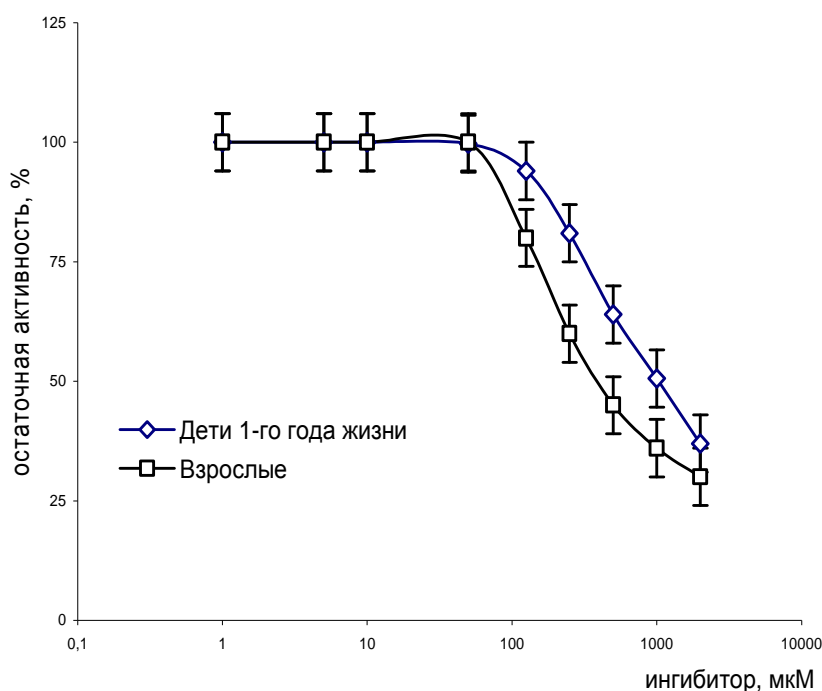


Рис.13 Влияние бычьего КМ-7 на скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови взрослых (n=5 чел) и детей 1-го года жизни (n=6 чел).

Необходимо отметить, что обнаруженный нами *in vitro* ингибирующий эффект КМ маловероятен *in vivo*, поскольку накопление таких больших концентрациях пептида (0,1 – 1 мМ) в тканях в норме невозможно (за исключением, может быть, ЖКТ).

Косвенным подтверждением этого является отсутствие какой-либо корреляции между ирКМ-7 и общей энкефалиназой сыворотки крови, как по обеим генеральным выборкам (естественное вскармливание, искусственное вскармливание), так и в отдельных возрастных группах детей.

Таким образом, снижение активности ЭДФ у детей на искусственном вскармливании, по-видимому, не связано с ингибирующим эффектом КМ-7 на энкефалиназы крови, но, возможно, определяется либо другими экзогенными пептидами, поступающими из коровьего молока, либо выбросом эндогенных регуляторных пептидов, взаимодействующих с ЭДФ по принципу субстратного ингибирования.

2.4.2 Влияние КМ на связывание 3Н-спиперона с дофаминовыми и серотониновыми рецепторами

Поскольку патогенез аутизма связывают прежде всего с серотониновой и дофаминовой системами, мы исследовали способность КМ влиять на эти системы. Средство КМ-7 человека к серотониновым и дофаминовым рецепторам определяли *in vitro* по их конкуренции с 3Н-спипероном за связывание с мембранной фракцией фронтальной коры и стриатума мозга крыс, характеризующихся высокой плотностью 5-НТ₂-серотониновых и D₂-дофаминовых рецепторов, соответственно. Взаимодействия КМ-7 человека с D₂-рецепторами обнаружено не было – гептапептид не влиял на связывание 3Н-спиперона с рецепторами стриатума (преимущественно дофаминовыми), EC₅₀>80 мкМ. С другой стороны, способность КМ-7 взаимодействовать с серотониновыми рецепторами была выявлена. Показано, что, начиная с концентрации 500 нМ, КМ-7 человека способен вытеснять 3Н-спиперон из рецепторов фронтальной коры (рис.14). Кривые вытеснения исследуемого пептида и кетансерина параллельны и выходят на одно плато, что косвенно свидетельствует о конкурентном характере взаимодействия данных веществ с местами связывания спиперона. Предполагается, что это 5НТ₂-рецепторы. Поэтому при расчете значений K_i использовали 5-НТ₂-компоненту специфического связывания спиперона. K_i КМ-7 человека составило 4±1 мкМ. Известно, что КМ способны взаимодействовать с опиоидными рецепторами мю- и дельта типа. При этом, величины K_i КМ-7 при взаимодействии с опиоидными рецепторами составляют от 5 мкМ для мю- до 20 мкМ для дельта-рецепторов (Koch et al., 1990). Полученные нами показатели сродства КМ-7 человека к 5НТ₂-рецепторам находятся в этом же диапазоне.

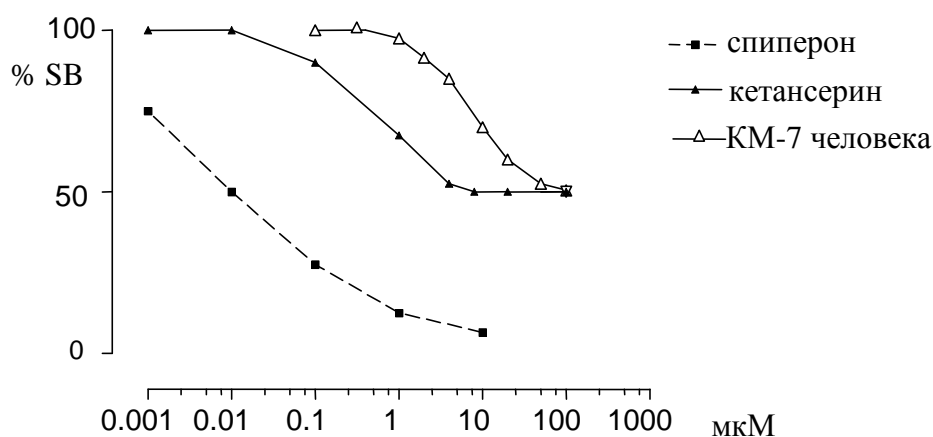


Рис.14 Влияние кетансерина и КМ-7 человека на специфическое связывание ³Н-спиперона с рецепторами фронтальной коры головного мозга крыс. Ось ординат - % специфического связывания, ось абсцисс – логарифмическая шкала.

2.4.3 Влияние КМ на серотонин-индуцированную агрегацию тромбоцитов

Для подтверждения способности КМ-7 взаимодействовать с 5-НТ₂-серотониновыми рецепторами и установления агонист/антагонистического характера этого взаимодействия, изучали влияние человеческого и бычьего КМ-7 на агрегацию тромбоцитов человека *ex vivo*. Установлено, что в исследованном диапазоне концентраций оба пептида сами по себе не вызывают агрегацию, то есть не являются агонистами серотониновых, а также других рецепторов тромбоцитов, активация которых приводит к агрегации. Вместе с тем, оба КМ-7 дозозависимо блокируют серотонин-индуцированную агрегацию (рис.15), то есть являются антагонистами 5-НТ₂-рецепторов.

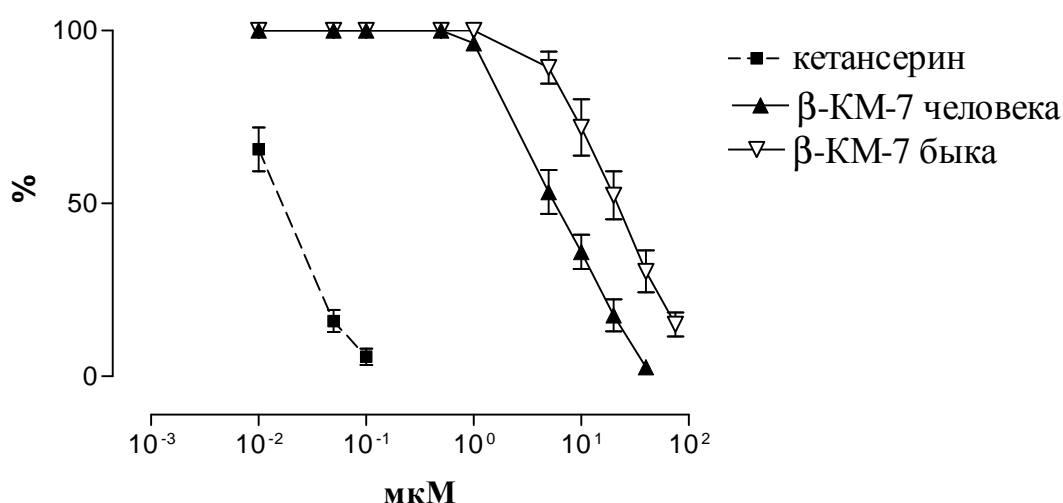


Рис.15 Влияние КМ-7 быка и человека на серотонин-индуцированную (10 мкМ) агрегацию тромбоцитов человека. По ординате – снижение агрегации в % от контроля.

IC₅₀ КМ-7 человека и быка в этом тесте составило, соответственно, 5±1 и 20±4 мкМ. При этом ингибирующая активность пептидов оказалась значительно слабее, чем у кетансерина (IC₅₀ 10±2 нМ).

2.4.4 Влияние КМ-7 человека и быка на поведенческие проявления гиперфункции серотониновой системы мышей

Возможное влияние КМ на серотониновую систему исследовали также *in vivo* на мышцах линии Valb/c в тесте «встряхивание головой». Показано, что КМ-7 обладают сравнимой способностью блокировать индуцированную 5-гидрокситриптофаном гиперфункцию серотониновой системы. Этот эффект является дозозависимым, проявляется в виде тенденции при использовании пептидов в дозах 0,01 и 0,10 мг/кг (p<0.2) и стано-

вится достоверным при введении пептидов в дозе 1 мг/кг. В этой дозе КМ-7 человека и быка одинаково снижали выраженность гиперкинеза на 50% (рис.16). Введение блокатора опиоидных рецепторов налоксона само по себе не приводило к изменению поведения животных в используемом тесте. Вместе с тем, при одновременном введении с пептидами, налоксон полностью блокировал эффекты КМ. Эффекты КМ-7, зарегистрированные в данном тесте, можно объяснить продемонстрированными *in vitro* у этих пептидов свойствами антагонистов серотониновых рецепторов. Вместе с тем, блокада эффектов КМ-7 налоксоном свидетельствует об участии опиоидзависимого этапа в цепи событий, индуцированных КМ и приводящих к снижению поведенческих проявлений фармакологически индуцированной гиперфункции серотониновой системы.

Таким образом, тремя независимыми методами установлена способность казоморфинов быка и человека влиять на серотониновую систему.

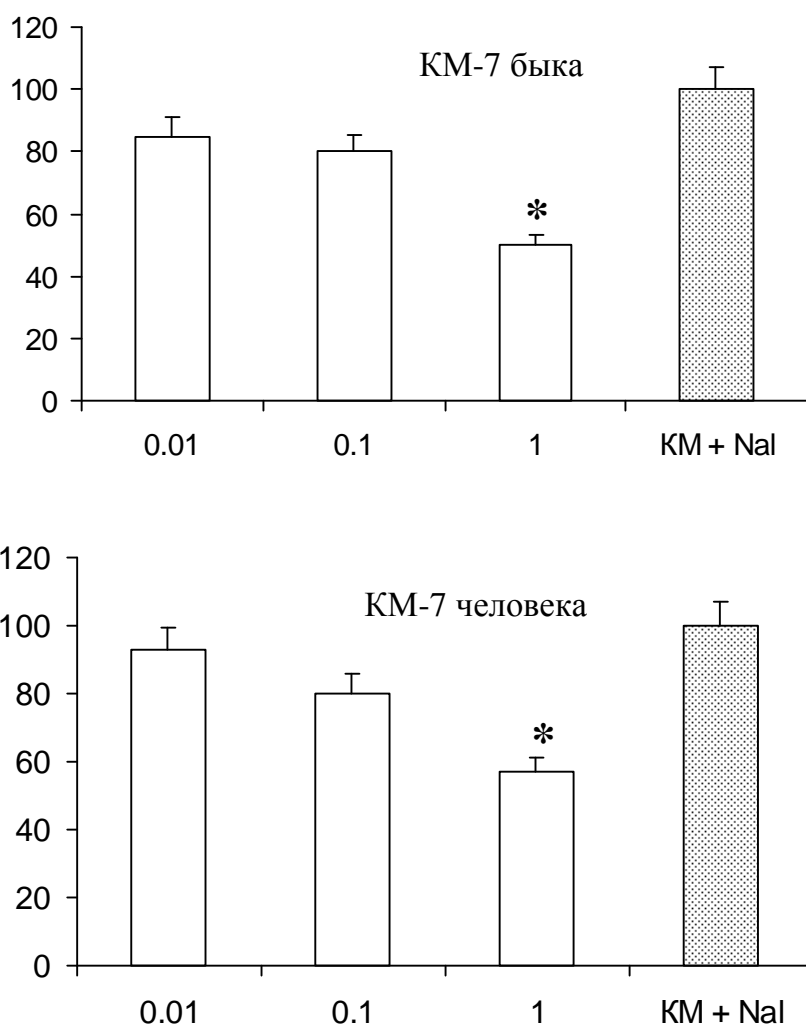


Рис.16 Влияние КМ-7 быка и человека на гиперфункцию серотониновой системы у мышей Valb/c в тесте «Встряхивание головой».

По оси ординат – % от контроля. * - эффект пептида, $p < 0,01$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ данных литературы показывает существенный недостаток информации об особенностях функционирования ОС детей в норме и при стресс-индуцированных нарушениях развития. В проведенной нами работе впервые показано, что опиоидная система (ОС) действительно задействована в физиологических процессах развития ребенка в различные возрастные периоды, оказывает защитное и адаптогенное действие в разных стрессовых ситуациях.

Использование равномерно меченого тритием лей-энкефалина позволило с высокой чувствительностью протестировать суммарную энкефалиназную активность в минимальном объеме сыворотки крови детей. С помощью данного микрометода впервые продемонстрирована взаимосвязь времени полужизни эндогенных опиоидных пептидов энкефалинов с конституционально-личностными особенностями детей разного возраста, их темпераментом, полом, показателями развития. Таким образом, удалось расширить представления о биохимическом базисе, лежащем в основе поведенческих особенностей человека.

Установлено, что при нарушениях психомоторного развития различного генеза существует «универсальная» реакция ОС, выражающаяся в падении активности пептидаз и увеличении времени циркуляции опиоидных пептидов в крови ребенка (рис.17).

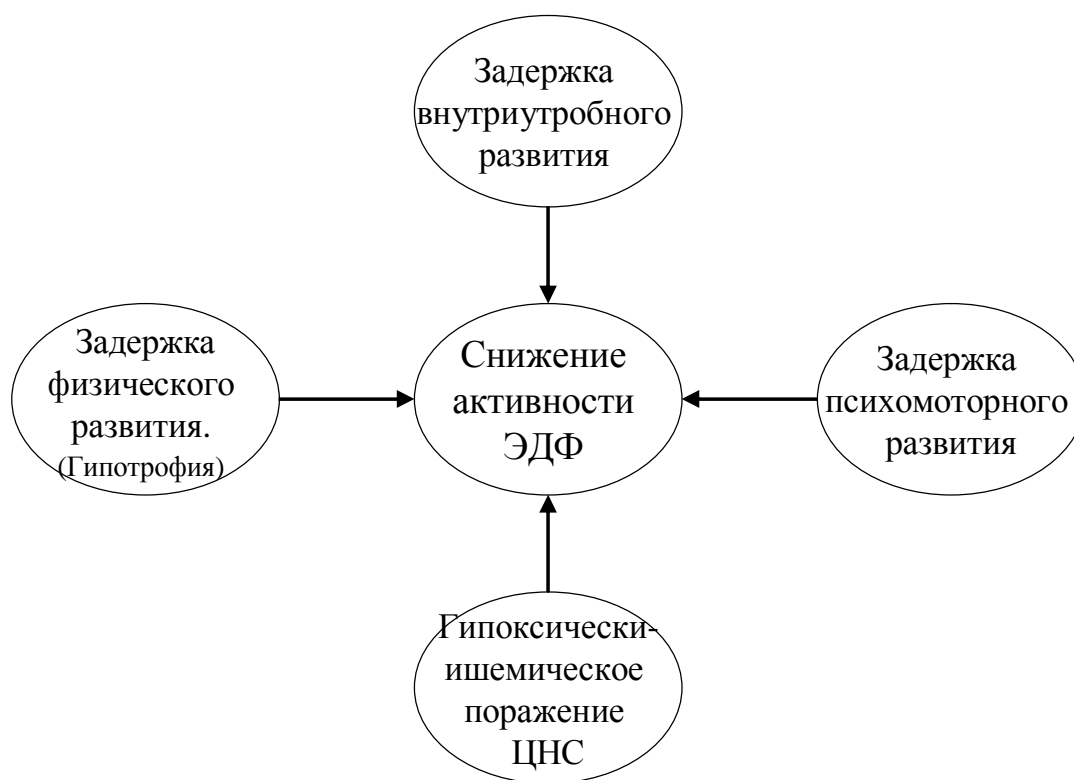


Рис. 17. Универсальная реакция ОС при нарушениях развития детей различного генеза.

Данный механизм реагирования обнаружен у новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС, при задержке внутриутробного развития, у грудных детей с задержкой психомоторного развития и при гипотрофии.

Полученные нами данные о состоянии ОС у младших школьников в условиях стресс-индуцированного расстройства при НДМП говорят о необходимости учитывать индивидуальные особенности ребенка при формировании условий его окружения и микроклимата в семье.

Установлено, что, помимо эндогенных опиоидных пептидов, существенным фактором в обеспечении гармоничного развития детей, особенно на первом году жизни, являются экзогенные опиоидные пептиды пищевого происхождения. С помощью специально разработанных высокочувствительных методов радио- и иммуноферментного анализа экспериментально доказано, что в организме ребенка действительно циркулируют экзогенные опиоидные пептиды казоморфины. Впервые установлены индивидуальные различия в метаболизме КМ-7 быка и человека в крови, а также взаимосвязь содержания этих пептидов в крови с уровнем психомоторного развития детей. Оказалось, что высокие концентрации человеческого КМ-7 в крови ребенка соответствует нормальному уровню ПМР, а повышенное содержание бычьего казоморфина, попадающего в организм при вскармливании искусственными смесями на основе коровьего молока, наоборот, обнаружено у грудных детей с задержкой темпов развития.

Таким образом, показано, что естественное вскармливание создает оптимальные физиологические условия формирования ОС ребенка и, соответственно, нормального ПМР. Доказана необходимость длительного, до года включительно, естественного вскармливания детей и это особенно важно для детей с патологией ПМР.

По-видимому, в норме здоровый организм грудного ребенка способен справиться с метаболическим стрессом искусственного вскармливания без ущерба для своего развития. Однако, при стресс-индуцированном срыве адаптационных возможностей организм ребенка теряет способность «регулировать» поступление и выведение экзогенных опиоидных пептидов, что приводит к их накоплению и ведет к дисбалансу регуляторных пептидергических систем, что, в конечном итоге, негативно отражается на развитии ЦНС. Действительно, снижение активности энкефалиназ в сыворотке крови и замедленное выведение казоморфина быка было обнаружено нами у детей первого года жизни с задержкой ПМР. В моче детей 5-7 летнего возраста с аутистическими расстройствами также обнаружено повышенное содержание казоморфина быка по сравнению с нормой. При-

чем содержание бычьего КМ-7 в моче прямо коррелирует с тяжестью аутистической патологии. Полученные данные подтверждают известную «опиоидную» теорию патогенеза аутизма.

Наши данные позволяют предположить, что у грудных детей с нарушениями ПМР следует по возможности избегать искусственного вскармливания или крайне осторожно подбирать молочные смеси, отдавая предпочтение альбуминдоминирующим составам над казеиндоминирующими. У детей более старшего возраста, например при аутистических расстройствах, могут быть полезны безказеиновые диеты или ферментные препараты, улучшающие белковый метаболизм и снижающие пептидную «нагрузку».

Сложно объяснить эффекты КМ на процессы ПМР только их влиянием на опиоидную систему. В наших исследованиях проводилось изучение других возможных молекулярных механизмов биологического действия этих пептидов. Здесь в качестве возможных мишеней действия мы рассматривали дофаминовую и серотониновую нейромедиаторные системы, участие которых в развитии ЦНС детей многократно продемонстрировано. В результате, тремя независимыми методами была определена способность казоморфинов быка и человека взаимодействовать с серотониновой системой. Нами впервые показано, что КМ-7 проявляют свойства антагонистов 5-HT₂-рецепторов и, следовательно, способны влиять не только на нейрональную активность через опиоидные рецепторы, но и контролировать через серотониновые рецепторы тонус кровеносных микрососудов, причем как в ЦНС, так и на периферии.

Вместе с тем, было бы неправильно связывать нарушения ПМР только с действием казоморфинов. По-видимому, казоморфины – лишь маленькая часть огромного пептидного континуума, действующего в организме. Однако их содержание в крови, равно как активность энкефалиназ, является своеобразным маркером состояния пептидергических систем, и поэтому имеет определенную прогностическую значимость.

Полученные нами данные значительно расширяют представления о биологических функциях опиоидных пептидов. Показано, что эти вещества обладают множественностью механизмов действия и играют важную роль в процессах развития детей. Следовательно, влияя на пептидергические системы ребенка, можно будет в будущем корректировать его развитие.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлено, что состояние опиоидной системы организма детей зависит от возраста и пола. Показано, что скорость гидролиза опиоидных пептидов в сыворотке крови достоверно снижается в ряду: новорождённые (1 месяц жизни) - дети 1-го года жизни - младшие школьники 7-12 лет. Скорость гидролиза энкефалинов в сыворотке крови девочек достоверно ниже, чем у мальчиков.
2. Активность энкефалиндеградирующих ферментов связана с конституционально-личностными характеристиками детей первого года жизни. $T_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови детей 1-го года жизни положительно коррелирует с характеристиками темперамента «активность», «приятие» и «порог».
3. Впервые обнаружено влияние вида вскармливания на опиоидную систему детей 1-го года жизни - у детей, находящихся на естественном вскармливании, скорость гидролиза лей-энкефалина в сыворотке крови достоверно выше, чем у детей, получающих искусственные смеси на основе коровьего молока. Впервые *in vitro* показано, что бычий казоморфин-7 ингибирует энкефалиназы сыворотки крови как грудных детей (IC_{50} 1 мМ), так и взрослых доноров (IC_{50} 350 мкМ).
4. При различных нарушениях развития у детей первого года жизни выявлена протективная реакция опиоидной системы, связанная со снижением скорости деградации опиоидных пептидов энкефалинов в крови. Это обнаружено:
 - у новорожденных детей с тяжелым гипоксически-ишемическим поражением (ГИП) ЦНС, по сравнению с ГИП ЦНС средней тяжести и здоровыми новорожденными.
 - у доношенных детей с задержкой внутриутробного развития по сравнению с доношенными, масса которых соответствовала гестационному возрасту.
 - у детей с задержкой психомоторного развития (ПМР), по сравнению с детьми с нормальным уровнем ПМР.
 - у детей с гипотрофией, по сравнению с детьми с гармоничным физическим развитием.

5. Впервые показана связь показателей опиоидной системы с психологическими характеристиками детей 7-12 лет в условиях хронического стресса при нейрогенной дисфункции мочевого пузыря:
- $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови этих детей положительно коррелирует с общительностью ребенка и его отношением к сверстникам и отрицательно с замкнутостью ребенка.
 - у детей отвергающих болезнь (вариант адаптации к стрессу) $t_{1/2}$ лей-энкефалина выше, чем у ее признающих.
 - $t_{1/2}$ лей-энкефалина в сыворотке крови положительно коррелирует с уровнем тревожности ребенка.
6. Впервые на основе оригинального высокочувствительного метода радиоиммунного анализа показано, что в крови детей первого года жизни, находящихся на естественном и искусственном виде вскармливания, циркулируют опиоидные пептиды пищевого происхождения казоморфины-7 (КМ-7) человека и быка, соответственно. Содержание КМ-7-иммунореактивного материала (ирКМ-7) человека и быка в плазме крови достоверно повышается через 3 часа после кормления у детей первых 3 месяцев жизни.
7. Впервые выявлена взаимосвязь содержания ирКМ-7 в крови с уровнем ПМР детей первого года жизни. У детей на естественном вскармливании задержка темпов ПМР и мышечный гипертонус соответствует низкому содержанию ирКМ-7 человека в плазме крови. У детей на искусственном вскармливании тем же симптомам соответствует высокое содержание ирКМ-7 быка в плазме крови.
8. Пилотные исследования на основе оригинального высокочувствительного метода конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа показали, что содержание ирКМ-7 быка в моче детей 5-7 лет с аутистическими расстройствами выше, чем у здоровых детей того же возраста. Продемонстрирована взаимосвязь содержания ирКМ-7 быка с тяжестью заболевания: более высокие концентрации обнаружены при детском аутизме (F 84.0, синдром Каннера), чем при синдроме Аспергера (F 84.5); выявлена положительная корреляция между ирКМ-7 быка в моче и тяжестью заболевания по Childhood Autism Rating Scale.

9. Впервые показана способность КМ-7 взаимодействовать с серотониновой системой:
- КМ-7 человека вытесняет ³H-спиперон из 5-HT₂-серотониновых рецепторов фронтальной коры головного мозга крыс, K_i 4±1 мкМ.
 - человеческий и бычий КМ-7 дозозависимо блокируют индуцированную серотонином агрегацию тромбоцитов человека *ex vivo*, IC₅₀ КМ-7 человека и быка, 5±1 и 20±4 мкМ, соответственно. При этом сами гептапептиды агрегацию не вызывают и, следовательно, обладают свойствами антагонистов 5-HT₂-рецепторов.
 - КМ-7 человека и быка достоверно ослабляют поведенческие проявления гиперфункции серотониновой системы мышей, индуцированные введением 5-гидрокситриптофана (тест "встряхивание головой"); эффект пептидов полностью блокируется налоксоном.
10. В процессе психомоторного развития детей опиоидные пептиды оказывают защитное и адаптогенное действие, при срыве адаптации могут оказывать негативное влияние. Нейрохимический механизм наблюдаемых эффектов может быть опосредован не только опиоидной, но и серотониновой системами.

Список печатных работ по теме диссертации:

1. Sokolov O., Kost N., Koptelov O., Surkina I., Toropov A., Mouhin A., Gurevich K., Zozulya A. Stress-related mental disorders: anxiety and possible role of opioids // Abstr. of Symposium on AIDS, Drugs of Abuse and Neuroimmune Axis, San Juan, USA, 1996, P.42.
2. Зозуля А.А., Кост Н.В., Суркина И.Д., Мешавкин В.К., Гуревич К.Г., Торопов А.В., Зорин В.Ю., Соколов О.Ю., Мухин А.А. Возможная роль опиоидной системы в развитии тревожных расстройств // В кн. «Тревога и обсессии» (ред. А.Б.Смулевич) Москва, 1998, С. 332-333.
3. Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гуревич К.Г., Акатова Е.В., Алфимова М.В., Кост Н.В. «Определение общей энкефалиназной активности плазмы крови человека» // Нейрохимия, 2000, Т.17, N 2, С.150-156.

4. Соколов О.Ю., Габаева М.В., Иванов С.В., Кост Н.В., Алфимова М.В., Гуревич К.Г., Зозуля А.А., Смулевич А.Б. «Связь общей энкефалиназной активности плазмы крови с конституционально-личностными характеристиками человека» // Тезисы 13-го съезда психиатров России, Москва, 2000, С.370 .
5. Sokolov O, Gabaeva M, Kost N, Alfimova M, Gurevich K, Zozulya A. Blood plasma total «enkephalinase» activity depends on human personality // In Book «Cell-surface aminopeptidases: basic and clinical aspects», by Elsevier Science, Amsterdam, 2001, P.413-415.
6. Соколов О.Ю., Кост Н.В.. Лекарство для меланхоликов // Химия и жизнь, 2001г., №10. С.20-25.
7. Курасова О.Б., Гуменюк П.В., Соколов О.Ю.. Активность энкефалиндеградирующих ферментов у здоровых детей первого года жизни на разных видах вскармливания // Вестник РГМУ №1(22), Москва 2002, С.106.
8. Соколов О.Ю., Золотарев Ю.А., Кост Н.В., Зозуля А.А. Использование равномерно меченых тритием пептидов для исследования пептидаз на примере энкефалиндеградирующих ферментов плазмы крови человека// Тезисы V-го международного симпозиума «Химия протеолитических ферментов», Москва, апрель 2002г., С.124.
9. Зозуля А.А., Кост Н.В., Соколов О.Ю.. Поведенческие эффекты пептидов в норме и патологии // Тезисы 3го съезда биохимического общества, Санкт-Петербург, 26 июня – 1 июля, 2002г., С. 551
10. Курасова О.Б., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Габаева М.В., Корнеева Е.В., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Энкефалиназная активность сыворотки крови детей первого года жизни на разных видах вскармливания // Тезисы VII Конгресса педиатров России «Детская гастроэнтерология: настоящее и будущее», Москва, 12-14 февраля 2002, С.184-185.
11. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Верещагина Т.Г., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Зозуля А.А. Опиоидные пептиды экзогенного происхождения - бета-казоморфины и питание детей грудного возраста // Педиатрия. 2003г., №5, С. 96-99.
12. Курасова О.Б., Соколов О.Ю., Михеева И.Г., Габаева М.В., Верещагина Т.Г. Активность энкефалиндеградирующих ферментов сыворотки крови у здоровых детей первого года жизни и детей с задержкой темпов психомоторного развития, находящихся на разных видах вскармливания // 1-й Всероссийский конгресс «Совре-

- менные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва, 16-19 октября 2003, С.182-183.
13. Габаева М.В., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Мешавкин В.К., Золотарев Ю.А., Зозуля А.А. Взаимосвязь состояния эндогенной опиоидной системы с конституционально-личностными и поведенческими характеристиками // Тезисы всероссийской научно-практической конференции памяти профессора А.И.Белкина», «Актуальные проблемы психоэндокринологии» Москва 2004, С. 179-180.
 14. Kurasova O.B., Sokolov O.Yu., Gabaeva M.V., Kost N.V., Miheeva I.G., Vereschagina T.G. Zozulya A.A. Blood plasma enkephalinase activity of breastfeeding and bottle-feeding infants: interrelationship with temperament // 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (3-7.07.2004; Paris). P.278.
 15. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Верещагина Т.Г., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Зозуля А.А. Роль опиоидных пептидов эндогенного происхождения и бета-казоморфинов в питании детей первых месяцев жизни // Вопросы детской диетологии. 2004, том 2, №4, С.21-25.
 16. Кост Н.В., Курасова О.Б., Дмитриев А.Д., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Михеева И.Г., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А. Казоморфины в плазме крови детей первого года жизни, находящихся на разных видах вскармливания: взаимосвязь с психомоторным развитием // Тезисы 14 съезда психиатров России. Москва 15-18 ноября 2005. С.54.
 17. Соколов О.Ю., Пряникова Н.А., Кост Н.В., Золотарев Ю.А., Рюкерт Е.Н., А.А.Зозуля. Взаимодействие β -казоморфинов-7 с 5-НТ₂-серотониновыми рецепторами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. - №11. – С. 595 -597.
 18. Михеева И.Г., Кузнецова Н.И., Соколов О.Ю., Моисеев А.Б., Кольбе О.Б. Исследование активности энкефалиндеградирующих ферментов сыворотки крови детей с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря // Сборник научных работ по актуальным вопросам педиатрии (РГМУ, ИДГКБ) - М., 2006. – С.88-91.
 19. Sokolov O.Yu., Kost N.V., Zolotarev Yu.A., Ryukert E.N., Zozulya A.A. Influence of human β -casomorphin-7 on specific binding of ³H-spiperone to the 5-НТ₂-receptors of rat brain frontal cortex // Protein and Peptide Letters, 2006, V.13, № 2, P.169-170.
 20. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Кост Н.В., Верещагина Т.Г., Зозуля А.А. Вид вскармливания, психомоторное развитие, темперамент детей

- грудного возраста: связь с активностью энкефалиндеградирующих ферментов сыворотки крови // Педиатрия, 2006, №6, С.52-55.
21. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В., Козик В.С., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Дорохова Е.М., Мешавкин В.К., Габаева М.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Павлов Т.С., Бадмаева К.Е., Бадмаева С.Е., Самонина Г.Е., Васьковский Б.В., Гривенников И.А., Зозуля А.А., Мясоедов Н.Ф.. Равномерно меченные тритием пептиды в исследованиях по их специфическому связыванию и биodeградации in vivo и in vitro. // Биоорганическая химия. 2006. т. 32, № 2, С. 80-88.
22. Михеева И.Г., Кост Н.В., Корнеева Е.В., Курасова О.Б., Соколов О.Ю., Дмитриев А.Д., Габаева М.В., Золотарев Ю.А., Зозуля А.А. β -казоморфины-7 в плазме крови детей первого года жизни, находящихся на разных видах вскармливания: взаимосвязь с психомоторным развитием». // Сборник материалов Научно-практической конференции педиатров России «Фармакотерапия и диетология в педиатрии». - Москва 17-18 октября 2007 года. – С.115.
23. Соколов О.Ю., Мешавкин В.К., Кост Н.В., Зозуля А.А.. Влияние бета-казоморфинов на серотонинергическую систему. // Тезисы III российского симпозиума «Белки и пептиды», Пушкино, 16-21 сентября 2007. С. 91.
24. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Курасова О.Б., Дмитриев А.Д., Габаева М.В., Золотарев Ю.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Регуляторные пептиды и психомоторное развитие детей грудного возраста // Вестник РАМН, 2007, №3, С. 33-39.
25. Кост Н.В., Мешавкин В.К., Соколов О.Ю., Макаренкова В.П., Габаева М.В., Зозуля А.А. Биологические основы индивидуальной вариабельности анксиолитического действия опиоидов // Вестник РАМН, 2007, №3, С. 24-33.
26. Михеева И.Г., Кузнецова Н.И., Соколов О.Ю., Курасова О.Б., Бадяева С.А. Исследование энкефалиназной активности сыворотки крови у детей с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря // Тезисы Шестой Российский конгресс по детской нефрологии / М., 2007. С. 88.
27. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Корнеева Е.Н., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Верещагина Т.Г. Динамика иммунореактивности β -казоморфина-7 человека в плазме крови детей первого года жизни, находящихся на естественном вскармливании. // Тезисы Первого Объединенного Научно-Практического Форума Детских Врачей. Орел, 19-23 мая 2008 г. С.35.

28. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Корнеева Е.В., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Верещагина Т.Г. Динамика иммунореактивности β -казоморфина-7 быка в плазме крови детей первого года жизни, находящихся на искусственном вскармливании. // Тезисы Научно-практической конференции педиатров России «Фармакотерапия и диетология в педиатрии», VI Форума «Дети и лекарства», II Форума «Питание и здоровье детей». Иваново, 23-24 сентября 2008 г. С. 245.
29. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Корнеева Е.В., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Верещагина Т.Г. Содержание β -казоморфина-7 человека в плазме крови детей первого года жизни при естественном вскармливании: связь с психомоторным развитием // Вопросы детской диетологии. 2008. - №4. С.22-27.
30. Соколов О.Ю., Курасова О.Б., Кост Н.В., Габаева М.В., Корнеева Е.В., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Время полужизни лей-энкефалина в сыворотке крови детей первого года жизни на разных видах вскармливания: взаимосвязь с темпераментом // Бюлл.Эксп.Биол.Мед. том 137, №4, С. 387-389.
31. Михеева И.Г., Корнеева Е.В., Курасова О.Б., Верещагина Т.Г., Кост Н.В., Соколов О.Ю. Взаимосвязь показателей энкефалиназной активности сыворотки крови детей грудного возраста с особенностями их поведения в дошкольном возрасте // XII Конгресс педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» 20-22 февраля 2008 года. №377, С.225-226.
32. Ашмарин И.П., Багликова К.Е., Эдеева С.Е., Золотарев Ю.А., Козик В.С., Дадаян А.К., Дорохова Е.М., Алфеева Л.Ю., Андреева Л.А., Копылова Г.Н., Павлов Т.С., Васьковский Б.В., Мешавкин В.К., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Зозуля А.А., Самонина Г.Е., Мясоедов Н.Ф. Сравнительный анализ распределения глипролинов при разных способах введения // Биоорганическая химия 2008, 34(3) С.245 – 256.
33. Михеева И.Г., Николаева В.В., Кузнецова Н.И., Соколов О.Ю., Курасова О.Б., Моисеев А.Б., Кольбе О.Б., Бадяева С.А. Энкефалиназная активность сыворотки крови у детей с нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря // Педиатрия. – 2008 - Т.87, №3 - С.36-41.
34. Михеева И.Г., О.Б.Курасова, Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Верещагина Т.Г., Зозуля А.А., Содержание β -казоморфина-7 человека в плазме крови детей первого года жизни при естественном вскармливании: связь с психомоторным развитием. // Вопросы детской диетологии. 2008. №4.С.22-27.

35. Zozulya AA, Gabaeva MV, Sokolov OY, Surkina ID, Kost NV. Personality, coping style, and constitutional neuroimmunology. // J Immunotoxicol. 2008 Apr;5(2):P. 221
36. Зозуля А.А., Кост Н.В., Мешавкин В.К., Соколов О.Ю. Блокируемое налоксоном подавление бета-казоморфинами-7 человека и быка поведенческих проявлений гиперфункции серотонинергической системы мышей в тесте «встряхивание головой» // Экспериментальная и клиническая фармакология 2009. Т. 72(2). С. 3-5.
37. Михеева И.Г., Курасова О.Б., Корнеева Е.В., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Верещагина Т.Г., Зозуля А.А.. Опиоидные пептиды экзогенного происхождения (β -казоморфины) и психомоторное развитие детей грудного возраста, влияние различных видов вскармливания. // Педиатрия. 2009. том 87- №3. С. 66-69.
38. Kost NV, Sokolov OY, Kurasova OB, Dmitriev AD, Tarakanova JN, Gabaeva MV, Zolotarev YA, Dadayan AK, Grachev SA, Korneeva EV, Mikheeva IG, Zozulya AA. Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development // Peptides. 2009 Oct;30(10): P. 1854-60.
39. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Курасова О.Б., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Грачев В.В., Михеева И.Г. Иммуноферментный анализ содержания бычьего β -казоморфина-7 в моче детей с аутизмом // Тезисы 4-го Российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 23-27 июня 2009 г, С. 221.
40. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Мешавкин В.К., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г., Зозуля А.А. Возможная роль казоморфинов в патогенезе детского аутизма. // Психиатрия №3, 2010, С.29-35,
41. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Андреева О.О., Корнеева Е.В., Тараканова Ю.Н., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А., Грачев С.А., Михеева И.Г. Содержание бычьего казоморфина в моче при разных формах аутистических расстройств // Тезисы 4 международной конференции «Биологические основы чувствительности к психотропным препаратам», Подмосковье 2010. 1-4 июня, С.68
42. Соколов О.Ю., Кост Н.В., Курасова О.Б., Кузнецова Н.И., Корнеева Е.В., Яковлева А.А., Михеева И.Г., Мешавкин В.К., Габаева М.В, Золотарев Ю.А., Зозуля А.А. Опиоидные пептиды и психомоторное развитие детей. // Тезисы конференции памяти И.П.Ашмарина, Москва, 15 сентября 2010, С. 50.

Список сокращений:

АПФ – ангиотензинпревращающий фермент
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГИП ЦНС – гипоксически-ишемическое поражение ЦНС
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ЗВУР – задержка внутриутробного развития
ИФА – иммуноферментный анализ
КМ – казоморфин
ирКМ – содержание КМ-иммунореактивного материала
НДМП – нейрогенная дисфункция мочевого пузыря
ОР – опиоидные рецепторы
ОС – опиоидная система
ПМР – психомоторное развитие
РИА – радиоиммунный анализ
РРА – радиорецепторный анализ
T_{1/2} – время полужизни лей-энкефалина
ЦНС – центральная нервная система
ЭДФ – энкефалиндеградирующие ферменты
5-НТ – 5-гидрокситриптамиин