

Дизрегуляция нейротрансмиттерных систем и принципы комплексной патогенетической терапии паркинсонизма

*В.Г. Кучеряну, Г.Н. Крыжановский, Е.В. Бочаров, В.В. Полещук
НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН,
Научный центр неврологии РАМН (Москва)*

Развитие паркинсонизма обусловлено чаще всего деградацией нигральных дофаминергических нейронов и дизрегуляцией различных нейротрансмиттерных и нейрорепептидных систем, приводящих к растормаживанию, активации стриарных холинергических нейронов, а также образованию генератора патологически усиленного возбуждения (ГПУВ) в хвостатых ядрах.

Цель исследования: изучение нейрохимических и патофизиологических механизмов паркинсонизма и разработка принципов эффективной патогенетической терапии этого заболевания.

Методы исследования

Работа проведена на моделях экспериментального паркинсонического синдрома (ПС), индуцированного нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) или его конечным метаболитом 1-метил-4-фенилпиридином (МФП⁺) у крыс и мышей линии C57BL/6 и больных болезнью Паркинсона (БП) с использованием биохимических, биофизических, поведенческих, электрофизиологических, морфологических, иммунологических и клинических методов исследования.

Результаты

На разработанных нами экспериментальных моделях и в клинике предложены новые принципы комплексной патогенетической терапии паркинсонизма на основе

изучения механизмов повреждения и гибели нигростриарных нейронов.

В последние годы выявлена роль нарушения процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Можно полагать, что продукты ПОЛ являются одним из важных факторов повреждения и смерти дофаминергических нейронов нигростриарной системы при паркинсонизме [5, 11].

Состояние ПОЛ в стриатуме изучали на модели ПС, вызванного внутрибрюшинным введением пронейротоксина МФТП, интракаудатным или интранигральным введением нейротоксина МФП⁺ крысам 10-месячного возраста. У подопытных животных наблюдались все основные симптомы двигательных расстройств, характерных для паркинсонизма: олигокинезия, ригидность и тремор. Отмечалось преобладание олигокинезии и ригидности. Тремор у животных появлялся лишь в начале развития синдрома и был кратковременным. Двигательные нарушения, характерные для ПС, были наиболее выражены у крыс после интранигрального введения МФП⁺. Развитие у крыс паркинсонического синдрома после введения МФТП сопровождалось увеличением в стриатуме уровня конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). При развитии ПС, вызванного интранигральным введением МФП⁺, наблюдалось достоверное и максимальное увеличение продуктов МДА в стриатуме [6]. Установлено также повышение содержания продуктов ПОЛ и сни-

жение активности ферментов антиоксидантной системы – каталазы и супероксиддисмутазы в плазме крови больных с БП [2].

Данные о снижении активности АОС и важной роли ПОЛ в патогенезе паркинсонизма свидетельствуют о целесообразности применения антиоксидантов в терапии ПС.

Выраженным антиоксидантным и мембранотропным действием обладает мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридин сукцинат), который, наряду с этим, характеризуется способностью усиливать окислительное фосфорилирование в митохондриях и повышать уровень дофамина в стриатуме. На модели МФТП-индуцированного паркинсонизма установлено, что применение антиоксиданта мексидола, вводимого перорально, способно снизить уровень продуктов ПОЛ в стриатуме животных с ПС. Комплексное применение мексидола с антипаркинсоническим препаратом леводопой позволило снизить дозу последнего в 5 раз и повысить эффективность антипаркинсонической терапии [4].

Нами была разработана липосомальная форма дофамина методом активной его загрузки с помощью градиента сульфата аммония, что позволило существенно увеличить доставку дофамина в мозг. Парентеральное введение липосомальной формы дофамина мышам с ПС снижало выраженность паркинсонической симптоматики в течение 24 часов [26].

Выявлено участие нейропептида субстанции Р, глутамата и нейротрофических факторов (основного и кислого фактора роста фибробластов) в механизмах повреждения и гибели нигростриарных нейронов, формирования и развития ПС. Субстанция Р синтезируется в стриатуме и в черной субстанции. В норме этот нейропептид оказывает активирующее влияние на синтез дофамина, однако при паркинсонизме отмечается снижение уровня субстанции Р как в среднем мозге, так и в стриатуме [12]. Выявлено также уменьшение количества рецепторов нейрокина-1 для субстанции Р в бледном шаре при паркинсонизме [14].

В наших исследованиях мы изучали влияние субстанции Р на активность ключевого патофизиологического механизма паркинсонизма – генератора патологически усиленного возбуждения (ГПУВ) и выраженность паркинсонических симптомов, индуцированных различными способами: системным многократным введением МФТП и однократным введением резерпина. Установлено, что введение субстанции Р в

ростральные отделы стриатума в дозе 5 мкг/кг или интраназально в дозе 5 мкг/кг крысам при МФТП-индуцированном ПС полностью подавляло активность ГПУВ и понижало выраженность паркинсонических симптомов – олигокинезии, ригидности и тремора. При этом у животных с паркинсонизмом после применения субстанции Р отмечалось снижение электрической активности, нередко до исходного уровня, уменьшение частоты, амплитуды и продолжительности пароксизмальных разрядов и частоты и амплитуды медленных волн в хвостатых ядрах до 100–150 мВ [3].

Можно полагать, что в повреждении дофаминергических нигростриарных нейронов участвует возбуждающий нейротрансмиттер глутамат, который обнаруживает так называемую эксайтотоксичность при значительной кумуляции в нейрональных клетках в условиях патологии ЦНС. Мы изучали влияние глутамата при интранигральном введении и исследовали эффект антагониста NMDA-глутаматных рецепторов мемантина на развитие МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у крыс. Интранигральное введение глутамата intactным животным не изменяло их поведенческую активность. Однако введение глутамата в черную субстанцию старым крысам с МФТП-индуцированным ПС усиливало выраженность паркинсонических симптомов – олигокинезии и ригидности. Предварительное, параллельное с МФТП, введение антагониста NMDA-рецепторов мемантина снижало степень развития олигокинезии и мышечной ригидности и предупреждало усиление паркинсонической симптоматики, вызванной интранигральным введением глутамата у крыс с МФТП-индуцированным ПС [7]. Полученные нами результаты свидетельствуют о важной роли глутамата в механизмах дегенерации и гибели нигростриарных нейронов и развитии паркинсонизма, а также о перспективности применения антагонистов NMDA-рецепторов в комплексной патогенетической терапии БП.

Исследования последнего времени свидетельствуют, что ростовые факторы – мозговой нейротрофический фактор (МНТФ), факторы роста фибробластов кислый (кФРФ) и основной (оФРФ) способны вмешиваться в процесс нейродегенерации и защищать нейроны от повреждения при паркинсонизме [23]. Показано, что кФРФ и оФРФ присутствуют в дофаминергических нейронах черной субстанции человека и животных, оказывают на них нейротрофический и нейропротективный эффекты при повреждении нейротоксинами

МФП⁺ и 6-гидрооксидофамином [9, 23б 25]. оФРФ при системном введении способен предотвратить гибель нейронов крыс, индуцированной интратриатным введением NMDA или гипоксией. При БП оФРФ обнаруживался только в 8,2% нигральных нейронов, тогда как у лиц контрольной группы соответствующего возраста этот нейротрофоген выявлялся в 93% дофаминергических нейронов черной субстанции [24].

Исходя из этого, мы изучали влияние оФРФ и кФРФ на развитие ПС у мышей линии C57BL/6, вызванного многократным системным введением МФТП, и исследовали изменения численности нигральных нейронов.

Результаты наших исследований показали, что интраназальное введение оФРФ или кФРФ в дозе 3 мкг на мышь 3 раза до и на 3-е и 5-е сут. после введения МФТП снижало развитие олигокинезии и мышечной ригидности на 5-й день при полном ее исчезновении на 7 и 10 дни введения нейротоксина. кФРФ был способен также редуцировать тремор у мышей среднего (7 мес.) возраста с МФТП-индуцированным паркинсонизмом. Интраназальное введение кФРФ мышам старого (14 мес.) возраста с ПС практически не влияло на развитие паркинсонических симптомов – олигокинезии и ригидности [8].

Морфологическое исследование срезов мозга в области черной субстанции показало, что число поврежденных нейронов, в том числе и необратимо дегенерированных, достигало 67,2±3,2%, при 8,3±5,6% у животных, которым вводили физ. раствор [18]. При совместном введении мышам МФТП и ФРФ наблюдалось снижение числа поврежденных нейронов в черной субстанции по сравнению с группой мышей, которым вводили только МФТП. Снижение числа поврежденных нейронов наблюдалось при использовании обоих факторов роста фибробластов. В случае введения оФРФ число поврежденных нигральных нейронов снижалось до 22,1±4,5%, а при использовании кФРФ – до 27,6±4,1% [19].

Таким образом, оба фактора роста фибробластов, кислый и основной, при интраназальном введении способны ослаблять или задерживать дегенеративный процесс, предупреждать гибель или способствовать восстановлению обратимо поврежденных нейронов в черной

субстанции при паркинсонизме. Однако у этих нейропептидов, выделяемых из гипофиза мозга, есть один недостаток – их высокая стоимость (1 мг ФРФ стоит 468000 долларов США), что резко снижает их шанс стать антипаркинсоническими лекарственными средствами. В связи с этим важными могли бы быть комплексные фитоадаптогены, компонентами которых являются биологически активные вещества из растений, в частности, из семейства аралиевых. Они обладают нейропротекторными, нейротрофическими и антиоксидантными свойствами.

Показано, что сапонины и гинзенозиды Rb1, Rg1 и Rd, являющиеся биологически активными компонентами адаптогенов, блокируют NMDA-рецепторы, снижают активность апоптического фермента каспазы-3, содержание внутриклеточного Ca²⁺ и нейротоксичность глутамата, ингибируют чрезмерное образование свободных радикалов и NO, защищают дофаминергические нейроны от повреждения, уменьшают нейровоспалительный процесс в микроглии черной субстанции [13, 16, 17, 21, 20, 22].

В эксперименте показано, что пероральное введение комплексного фитоадаптогена мышам линии C57BL/6 при МФТП-индуцированном ПС ослабляло развитие олигокинезии и ригидности, предотвращало резкое снижение уровня дофамина и его метаболитов в стриатуме и снижало развитие апоптоза нигральных нейронов [1, 10]. Применение фитоадаптогена в комплексной терапии приводило к нормализации иммунного, цитокинового и антиоксидантного статуса пациентов с БП. Наряду с этим, у таких больных БП снижалась тяжесть паркинсонических симптомов – ригидности и тремора, повышалась двигательная и повседневная активность, что существенно улучшало их качество жизни.

Заключение

На основе проведенных исследований созданы принципиально новые подходы к патогенетической фармакотерапии паркинсонизма, направленной на предотвращение и остановку дегенерации и гибели нигростриатных дофаминергических нейронов.

Литература

1. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. и др. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. Бюл. эксперим. биол. мед. 2006; 5: 555–558.
2. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В. и др. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, лечение, профилактика). М.: Медицина, 2002.
3. Крыжановский Г.Н., Кучеряну В.Г., Годлевский Л.С., Мазарати А.Д. Влияние субстанции Р при ее интраназальном введении на паркинсонический синдром. Бюл. эксперим. биол. мед. 1992; 1: 16–19.
4. Кучеряну В.Г. Потенцирование мексидолом противопаркинсонического действия L-ДОФА на модели 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин-индуцированного паркинсонизма у мышей. Эксперим. клин. фармакол. 2001; 1: 22–25.

5. Кучеряну В.Г. Дизрегуляторные нейрохимические механизмы повреждения и смерти nigrostriatalных дофаминергических нейронов при паркинсонизме. В кн.: Г.Н.Крыжановский (ред.) Дизрегуляторная патология. М.: Медицина, 2002: 515–526.
6. Кучеряну В.Г., Атаджанов М.А., Никушкин Е.В. и др. Нарушение регуляции процесса перекисного окисления липидов в стриатуме крыс при паркинсоническом синдроме. Бюл. эксп. биол. мед. 1989; 1: 39–41.
7. Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. Влияние глутамата и антагонистов N-метил-D-аспартат-рецепторов на экспериментальный паркинсонический синдром у крыс. Бюл. эксп. биол. мед. 2000; 7: 20–23.
8. Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., Кудрин В.С. и др. Влияние кислого фактора роста фибробластов на развитие экспериментального паркинсонизма и уровень дофамина и его метаболитов в стриатуме у мышей разного возраста. Бюл. эксп. биол. мед. 1999; 5: 502–505.
9. Bean A.J., Elde R., Cao Y.H. et al. Expression of acidic and basic fibroblast growth factors in the substantia nigra of rat, monkey, and human. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991; 88: 10237–10241.
10. Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N. et al. Phytomix-40 reduces parkinsonian symptoms formation and apoptosis in substantia nigra in mice. Eur. J. Neurol. 2007; 14 (Suppl.1): 316–317.
11. Cadet J.L., Brannock C. Free radicals and the pathobiology of dopamine systems. Neurochem. Intern. 1998; 32: 117–131.
12. Chen L.W., Yung K.K., Chan Y.S. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. Curr. Drug Targets 2004; 5: 197–206.
13. Chen X.C., Zhu Y.G., Zhu L.A. et al. Ginsenoside Rg1 attenuates dopamine-induced apoptosis in PC12 cells by suppressing oxidative stress. Eur. J. Pharmacol. 2003; 473: 1–7.
14. Cui Q.L., Yung W.H., Chen L. Effects of substance P on neuronal firing of pallidal neurons in parkinsonian rats. Neurosci. Res. 2008; 60: 162–169.
15. Evans J.R., Barker R.A. Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. Expert. Opin. Ther. Targets 2008; 12: 437–447.
16. Kim E.H., Jang M.H., Shin M.C. et al. Protective effect of aqueous extract of Ginseng radix against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells. Biol. Pharm. Bull. 2003; Vol.26: 1668–1673.
17. Kim Y.C., Kim S.R., Markelonis G.J., Oh T.H. Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. J. Neurosci. Res. 1998; 54: 426–432.
18. Krasnova I.N., Bychkov E.R., Lioudyno V.I., Zubareva O.E., Dambinova S.A. Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Neuroscience 2000; 95: 113–117.
19. Kryzhanovsky G.N., Kucheryanu V.G., Krupina N.A. et al. Effects of fibroblast growth factors on MPTP-induced parkinsonian syndrome in mice. Pathophysiology 1997; 4: 59–67.
20. Lin W.M., Zhang Y.M., Moldzio R., Rausch W.D. Ginsenoside Rd attenuates neuroinflammation of dopaminergic cells in culture. J. Neural. Transm. 2007; 72 (Suppl.): 105–112.
21. Rudakewich M., Ba F., Benishin C.G. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenosides Rb(1) and Rg(1). Planta Med. 2001; 67: 533–537.
22. Tansey M. G., Frank-Cannon T. C., McCoy M. K. et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? Frontiers in Bioscience 2008; 13: 709–717.
23. Timmer M., Cesnulevicius K., Winkler C. et al. Fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 3 are required for the development of the substantia nigra, and FGF-2 plays a crucial role for the rescue of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine lesion. J. Neurosci. 2007; 27: 459–471.
24. Tooyama I., McGeer E.G., Kawamata T. et al. Retention of basic fibroblast growth factor immunoreactivity in dopaminergic neurons of the substantia nigra during normal aging in humans contrasts with loss in Parkinson's disease. Brain Res. 1994; 656: 165–168.
25. Tooyama I., Waliker D., Yamada T. et al. High molecular weight basic fibroblast growth factor-like protein is localized to a subpopulation of mesencephalic dopaminergic neurons in the rat brain. Brain Res. 1992; 593: 274–280.
26. Zhigaltsev I.V., Kaplun A.P., Kucheryanu V.G. et al. Liposomes containing dopamine entrapped in response to transmembrane ammonium sulfate gradient as carrier system for dopamine delivery into the brain of parkinsonian mice. J. Liposome Res. 2001; 11: 55–71.

Терапевтический потенциал модуляторов эндогенной каннабиноидной системы при болезни Паркинсона

М.Ю. Бобров, Л.Г. Хаспеков

*Научный центр неврологии РАМН, Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва)*

Основными функциональными звеньями эндоканнабиноидной системы (ЭКС) являются каннабиноидные рецепторы и их эндогенные лиганды — эндоканнабиноиды. Эндоканнабиноиды (ЭК) — липидные мессенджеры, которые при взаимодействии с каннабиноидными рецепторами осуществляют регуляцию энергетического метаболизма, боли, воспаления, а также участвуют в нейропротекторных механизмах и в модуляции многочисленных поведенческих реакций (см. обзор [2]). Идентифицировано два типа каннабиноидных рецепторов (КР1 и КР2), которые широко распределены по всему организму, с преимущественной локализацией КР1 в нервной ткани, а КР2 — в клетках им-

мунной системы. Плотность КР1 на стриарных проекционных нейронах, посылающих эфференты к бледному шару, энтопедункулярному ядру и черной субстанции, очень высока. Наряду с этим, там же обнаружены высокие концентрации ЭК, таких как анандамид (АНА) и 2-арахидоноилглицерол (2-АГ), что прямо указывает на важную функциональную роль ЭКС в регуляции движений [9].

Результаты исследований, свидетельствующие о модуляции активности дофамина и других нейромедиаторов в базальных ганглиях при активации ЭКС, позволили предположить, что ее фармакологическая регуляция может способствовать нормализации дофа-

минергической передачи и ослаблению двигательных расстройств при болезни Паркинсона. Обнаружено, что активность ЭКС в базальных ганглиях при болезни Паркинсона и ее моделировании у животных значительно возрастает, о чем свидетельствует повышение в ткани концентрации ЭК и усиление экспрессии КР1 [3]. Например, на резерпиновой модели паркинсонизма у крыс подавление локомоторных реакций сопровождается многократным повышением уровня 2-АГ в бледном шаре, а у больных болезнью Паркинсона, не подвергавшихся медикаментозному лечению, концентрация АНА в спинномозговой жидкости повышается, что указывает на прямую связь между каннабиноидной сигнализацией и симптоматикой болезни Паркинсона [12].

Одним из факторов повреждения нейронов при болезни Паркинсона является окислительный стресс (ОС). Известно, что некоторые природные и синтетические аналоги ЭК, например, такие как Δ^9 -тетрагидроканнабинол, каннабинол, набилон, дексанабинол и ряд других, содержащие в своей структуре фенольные группы, проявляют антиоксидантные свойства и препятствуют ОС [10]. Эффективными антиоксидантами являются также соединения, содержащие катехольные фрагменты [4]. Такие эндогенные эффекторы ЭКС, как N-ацилдо-

фамины, также содержат остаток катехола и поэтому могут обладать антиоксидантной активностью. Кроме того, эти соединения и их аналоги способны, в отличие от самого дофамина, проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать дофаминергическое действие, что может быть использовано для усиления дофаминергической передачи, дефицит которой является основным патогенетическим звеном при болезни Паркинсона [15]. Нейропротекторные и антиоксидантные свойства представителей семейства N-ацилдофаминов, N-докозагексаноилдофамина (ДГКДА), N-арахидоноилдофамина (ААДА) и N-олеоилдофамина (ОЛДА) исследовались нами в экспериментах на культурах клеток-зерен мозжечка, подвергнутых ОС, индуцированному перекисью водорода [1, 5]. Кроме того, было исследовано влияние ДГКДА на развитие симптомов болезни Паркинсона, моделируемой у мышей введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) [1].

Определение антиоксидантных свойств в пробе с гальвиноксидом показало, что ДГКДА, ААДА и ОЛДА как блокаторы кислородных радикалов почти в два раза более эффективны, чем природный липофильный антиоксидант α -токоферол (рис. 1). В экспериментах *in vitro* ДГКДА и ААДА оказывали выраженный нейро-

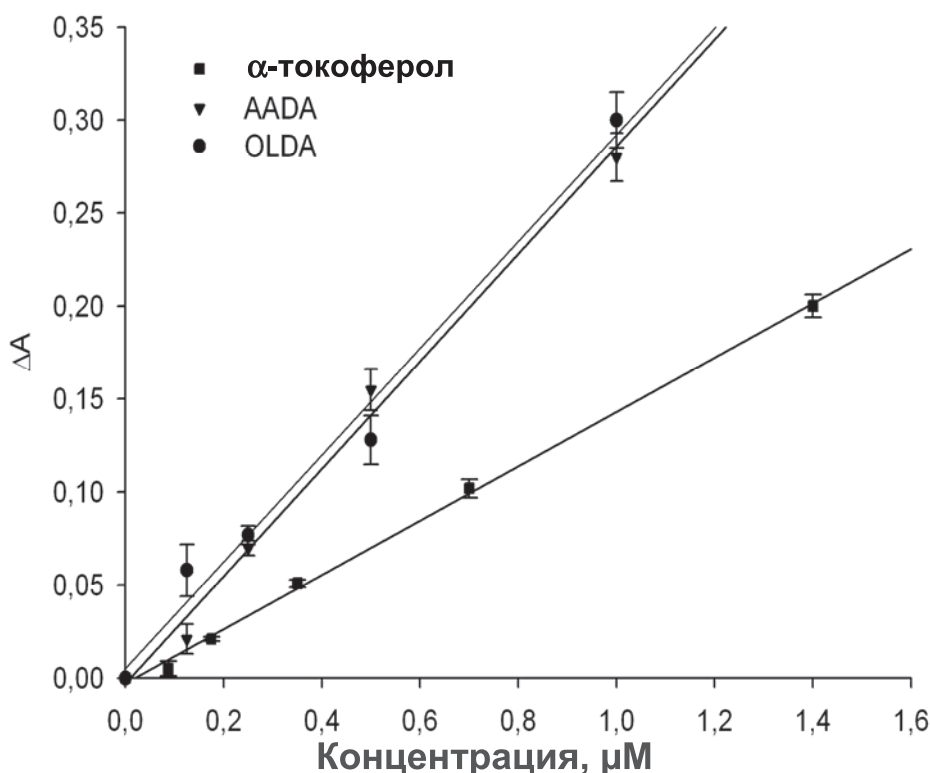


Рисунок 1. Антиоксидантная активность N-ацилдофаминов в тесте с гальвиноксидом

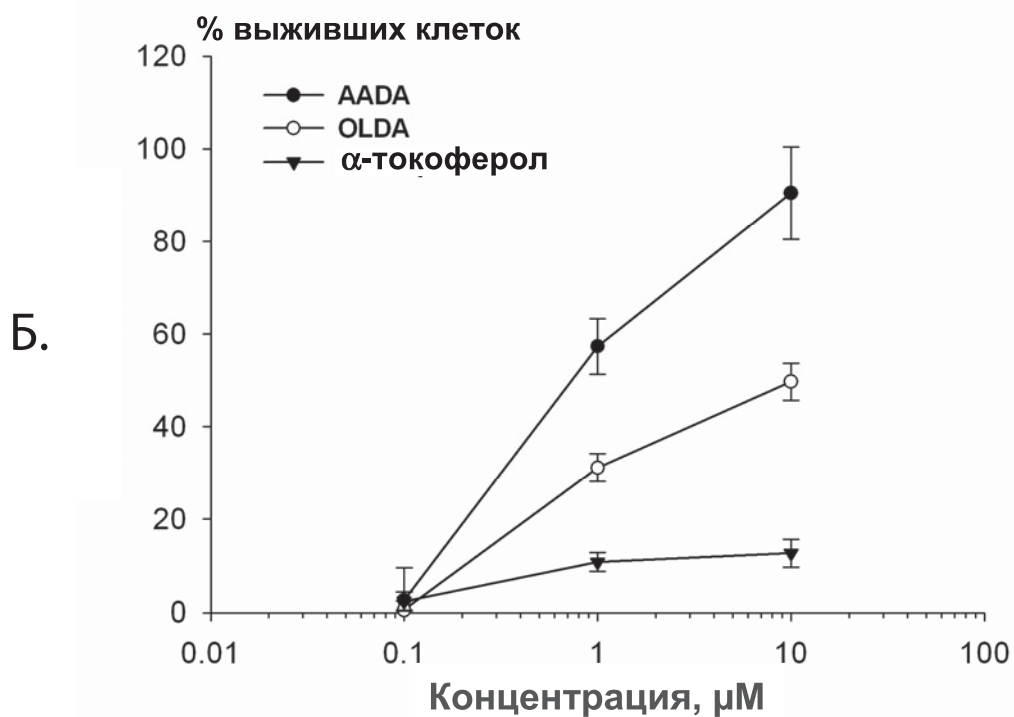
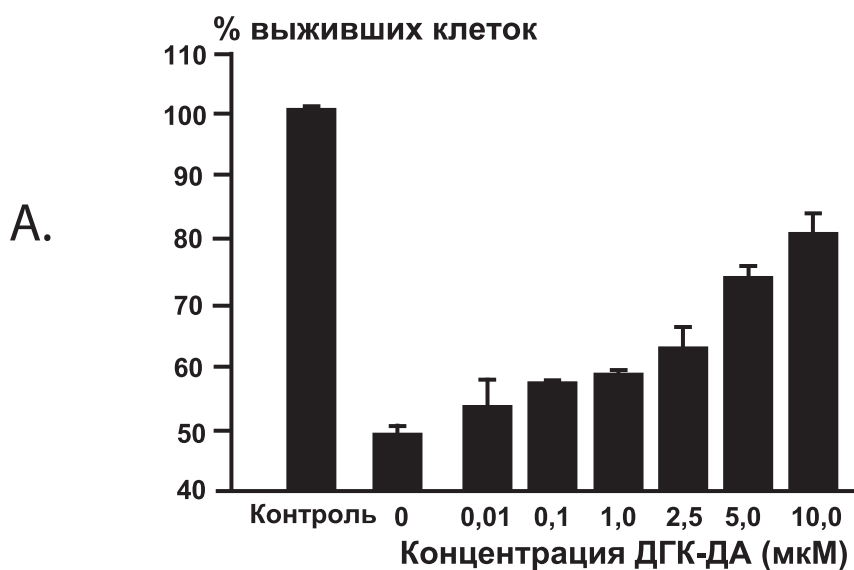


Рисунок 2.

А. Защитное действие ДГКДА в модели оксидативного стресса, индуцированного 1mM H₂O₂ в культуре клеток-зерен мозжечка крысы

Б. Защитное действие ААДА и ОЛДА в модели оксидативного стресса, индуцированного 0,1mM H₂O₂, в культуре клеток-зерен мозжечка крысы

протекторный эффект (рис. 2). По данным биохимического анализа (МТТ-тест), выживаемость нейронов при

действию ОС в присутствии максимально исследованной концентрации ААДА и ДГКДА (10 мкМ) возрастала

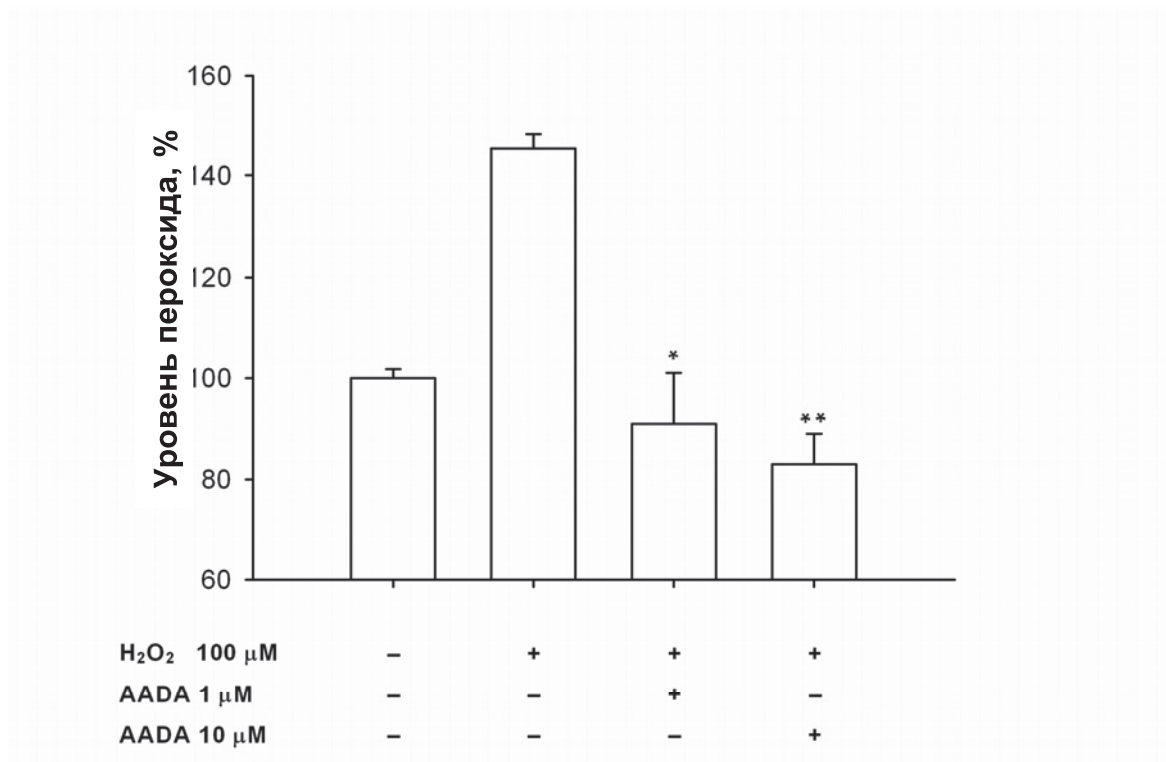


Рисунок 3. Влияние ААДА на содержание пероксидов в нейронах, подвергнутых оксидативному стрессу. Уровень пероксидов определяли с помощью ксиленолового оранжевого.

до 80-90%, тогда как в присутствии ОЛДА она составляла около 50%. Было показано, что действие N-ацилдофаминов связано с понижением уровня свободных форм кислорода в клетках и не сопряжено с каннабиноидными рецепторами (рис. 3).

В модели болезни Паркинсона у мышей двигательная активность животных в тесте «открытое поле» снижалась на 70%. Внутривентрикулярное введение ДГКДА (5 мг/кг) через 90 мин после инъекции МФТП (30 мг/кг) повышало на следующий день локомоторную активность в 1,5 раза (рис. 4). Однократное введение ДГКДА (10 мг/кг) после хронического (10 дней) введения МФТП приводило к возрастанию локомоторной активности в 1,8 раза (рис. 4).

Было также показано, что N-ацилдофамины обладают антиагрегационным действием, улучшают микроциркуляцию в тканях головного мозга крыс [17] а также обладают противовоспалительным потенциалом [14].

Таким образом, результаты, указывающие на антиоксидантные, нейропротекторные, противовоспалительные и другие свойства ряда N-ацилдофаминов, являются экспериментальным обоснованием возможности практического использования представи-

телей этого семейства для коррекции нейродегенеративных процессов при болезни Паркинсона.

В патогенезе болезни Паркинсона, как и ряда других нейродегенеративных заболеваний, большую роль играет нейротоксичность возбуждающего медиатора глутамата. В экспериментах на культурах клеток различных структур ЦНС был показан защитный эффект каннабиноидов при кислородно-глюкозной депривации нейронов, механизм которого связывают со способностью модуляторов ЭКС подавлять избыточный выброс глутамата при их взаимодействии с КР1, локализованными на пресинаптических глутаматергических терминалях. С другой стороны, некоторые каннабиноиды, такие как дексанабинол (HU-211) и АНА, воздействуя непосредственно на подтип глутаматных рецепторов к N-метил-D-аспартату, потенцируют синтез ЭК в постсинаптическом нейроне, усиливая их защитный эффект [13].

Еще одним важным патогенетическим фактором повреждения центральных нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при болезни Паркинсона, является активация глии. Одним из свойств каннабиноидов является их способность модулировать воздействие глии на нейроны и таким образом оказы-

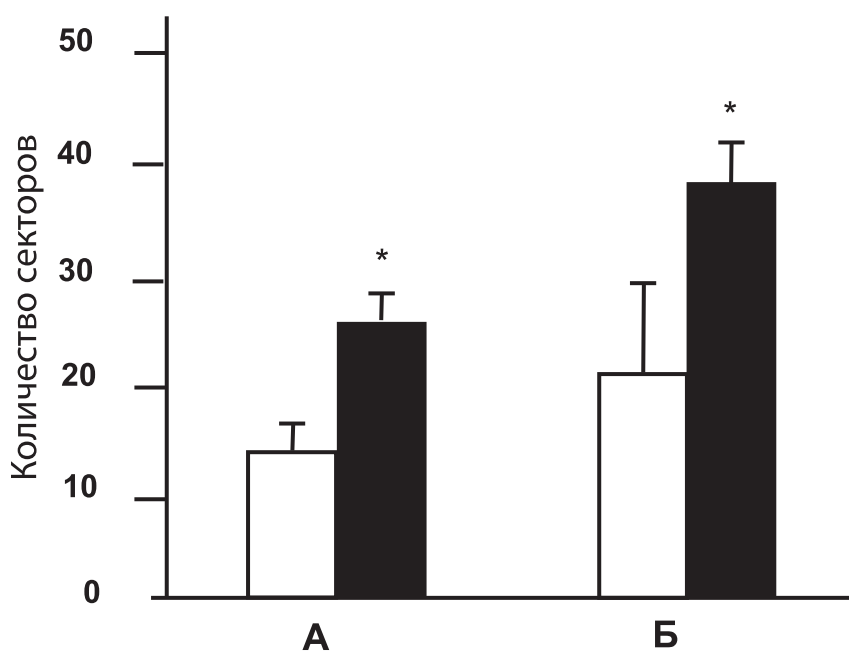


Рисунок 4. Влияние ДГКДА на снижение локомоторной активности у мышей, вызванное введением МФТП в остром (А) и хроническом (Б) опытах.

Светлые столбики – локомоторная активность после введения МФТП, темные – после введения МФТП и ДГКДА.
* $P < 0,1$ по сравнению с данными без ДГКДА

вать противовоспалительный эффект [16]. Гибель нейронов черной субстанции при болезни Паркинсона сопровождается пролиферацией астроцитов и реактивным микроглиозом, что, как полагают, играет важную роль в инициации и/или раннем прогрессировании нейродегенеративного процесса. Нейропротекторный эффект каннабиноидов может быть обусловлен их способностью снижать активность провоспалительных (TNF- α , IL-12) и повышать активность противовоспалительных (IL-10) цитокинов, продуцируемых реактивной глией. В экспериментах *in vitro* неселективный каннабимиметик HU-210 препятствовал гибели нейронов при действии 6-OHDA, причем защитный эффект был наиболее выражен, если в культурах присутствовала значительная популяция глиальных клеток, что указывает на участие каннабиноидов в регуляции нейроглиальных взаимодействий [8].

Одним из перспективных направлений в симптоматической терапии болезни Паркинсона может быть использование модуляторов ЭКС для устранения связанных с длительным применением леводопы моторных расстройств, к которым относятся тяжелые побочные эффекты, наблюдаемые примерно у 80% больных через 5 и более лет от начала курса лечения [7]. Эти эффекты проявляются в виде непредсказуемых флуктуаций дви-

гательной активности, в том числе дискинезии. Благодаря высокой плотности КР1 в бледном шаре на пресинаптических ГАМК-эргических терминалях стриопаллидарного пути стимуляция этих рецепторов каннабиноидами усиливает ГАМК-эргическую передачу в латеральном бледном шаре, подавляя обратный захват ГАМК. В результате дискинезия может ослабляться, как это было показано при применении агониста КР1 набилонна у больных болезнью Паркинсона, страдающих дискинезией, индуцированной леводопой. Сходные результаты были получены в экспериментах на модели болезни Паркинсона у низших обезьян, когда совместное применение набилонна и леводопы препятствовало тотальной дискинезии, вызываемой леводопой в отсутствие набилонна, однако в то же время не влияло на ее лечебный эффект [6].

Следует подчеркнуть, что одни симптомы болезни Паркинсона могут устраняться агонистами каннабиноидных рецепторов, тогда как другие – их антагонистами. Так, устранению тремора способствует применение агонистов КР1, что можно объяснить снижением гиперактивности субталамонигральных глутаматергических проекционных нейронов, тогда как при брадикинезии эффективным оказывается антагонист КР1 римонабант [11]. Поскольку болезнь Паркинсона представляет собой

гетерогенное заболевание, тремор может преобладать у одних больных, тогда как брадикинезия — у других. Однако в связи с тем, что оба эти симптома в той или иной степени присутствуют у одних и тех же больных, их сложно устранить, используя каннабиноиды со сходными фармакодинамическими свойствами. Поэтому для решения данного вопроса необходимы дальнейшие экспериментальные и клинические исследования.

Таким образом, каннабимиметики, являясь антиоксидантами, ингибиторами глутаматной токсичности и противовоспалительными соединениями, могут воз-

действовать на различные звенья этиопатогенеза болезни Паркинсона. С другой стороны, терапевтический потенциал лекарственных средств на основе каннабиноидов обусловлен не только их нейропротекторными свойствами, но и способностью агонистов и/или антагонистов каннабиноидных рецепторов модулировать побочные поведенческие эффекты леводопы, а также непосредственно влиять на моторные симптомы болезни Паркинсона. Поэтому использование модуляторов ЭКС в практике лечения болезни паркинсона представляется обоснованным и перспективным.

Литература

- 1 Бобров М.Ю., Лыжин Ф.Ф., Андрианова Е.Л. и др. Антиоксидантные и нейропротекторные свойства N-доказагексаеноилдофамин. Бюлл. эксп. биол. мед. 2006; 142: 406–408.
- 2 Хаспеков Л.Г., Бобров М.Ю. Эндогенная каннабиноидная система и ее защитная роль при ишемическом и цитотоксическом повреждении нейронов головного мозга. Нейрохимия 2006; 23: 85–105.
- 3 Benarroch E. Endocannabinoids in basal ganglia circuits: implications for Parkinson disease. Neurology 2007; 69: 306–309.
- 4 Bennett C.J., Caldwell S.T., McPhail D.B. et al. Potential therapeutic antioxidants that combine the radical scavenging ability of myricetin and the lipophilic chain of vitamin E to effectively inhibit microsomal lipid peroxidation. Bioorg. Med. Chem. 2004; 12: 2079–2098.
- 5 Bobrov M.Y., Lizhin A.A., Andrianova E.L. et al. Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine. Neurosci Lett. 2008; 431: 6–11.
- 6 Fox S.H., Henry B., Hill M. et al. Stimulation of cannabinoid receptors reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. Mov. Disord. 2002; 17: 1180–1187.
- 7 Lastres-Becker I., Fernandez-Ruiz J. An overview of Parkinson's disease and the cannabinoid system and possible benefits of cannabinoid-based treatments. Curr. Med. Chem. 2006; 13: 3705–3718.
- 8 Lastres-Becker I., Molina-Holgado F., Ramos J.A. et al. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. 2005; 19: 96–107.
- 9 Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. Handb. Exp. Pharmacol. 2005; 168: 299–325.
- 10 Marsicano G., Moosmann B., Hermann H. et al. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. J. Neurochem. 2002; 80: 448–456.
- 11 Papa S.M. The cannabinoid system in Parkinson's disease: multiple targets to motor effects. Exp. Neurol. 2008; 211: 334–338.
- 12 Pisani A., Fezza F., Galati S. et al. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. Ann. Neurol. 2005; 57: 777–779.
- 13 Romero J., Lastres-Becker I., de Miguel R. et al. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia: biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. Pharmacol. Ther. 2002; 2: 137–152.
- 14 Sancho R., Macho A., de la Vega L. et al. Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-arachidonoyldopamine inhibits activation of the NF-kappaB, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways. J. Immunol. 2004; 172: 2341–2351.
- 15 Shashoua V.E., Hesse G.W. N-Docosahexaenoyl-3-hydroxytyramine: a dopaminergic compound that penetrates the blood-brain barrier and suppresses appetite. Life Sci. 1996; 58: 1347–1357.
- 16 Smith S.R., Terminelli C., Denhardt G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000; 293: 136–150.
- 17 Vasil'eva T.M., Petrukhnina G.N., Makarov V.A. et al. Effect of dopamine amides of polyunsaturated fatty acids on blood coagulation system and cerebral circulation. Eksp. Klin. Farmakol. 2002; 65: 41–45.

Природные механизмы защиты мозга от нейродегенеративных повреждений, приводящих к нарушениям двигательной активности

*Т.Н. Федорова, С.Л. Стволинский, А.В. Куликов, Д.В. Гольдштейн,
А.А. Ржанинова, М.С. Степанова, М.С. Беляев, Р.М. Худоерков, Д.Н. Воронков, А.А. Болдырев
Научный центр неврологии РАМН, ЗАО «РеМетЭкс»,
Международный Биотехнологический Центр МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва)*

Нейродегенеративные заболевания, как правило, характеризуются развитием двигательных нарушений, которые в большинстве случаев являются частой причиной инвалидизации больных [2, 4]. На сегодняшний день

дефекты системы клеточной защиты, сопровождающиеся развитием окислительного стресса (ОС), рассматриваются как основные патологические процессы, приводящие к прогрессирующей и необратимой гибели

пораженных нейронов [3, 9]. Причины развития ОС определяются как эндогенными, так и экзогенными неблагоприятными средовыми воздействиями. Целесообразным подходом к регуляции ОС в условиях патологии является применение антиоксидантов природного происхождения [7]. С этой точки зрения, по нашему мнению, перспективным препаратом является природный нейропептид карнозин (β -аланил-L-гистидин), который, как показано, обладая широким спектром биологической активности, может служить эффективным протектором от ОС на клеточном и тканевом уровнях [1].

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности использования карнозина для защиты мозга от ОС на экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний, отягощенных введением нейротоксинов.

Предложенные модели нейродегенеративного повреждения мозга крыс линии Вистар включали комбинацию двух патологических факторов – гипоксии/ишемии и введения нейротоксина 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК). Нарушения митохондриальных процессов за счет необратимой блокады сукцинатдегидрогеназы являются основной причиной токсичности 3-НПК, способствующей развитию стойкого ОС. Введение 3-НПК животным вызывает селективную дегенерацию нейронов стриатума и специфические неврологические нарушения, часто завершающиеся гибелью [5]. Для оценки двигательной активности животных перед началом и в конце эксперимента тестировали в «открытом поле». Для защиты организма от ОС животным вводили природный нейропептид карнозин или стромальные стволовые клетки (интракраниально) после индукции их дифференцировки по нейрональному типу.

Защитные эффекты карнозина на фоне действия острой сублетальной гипобарической гипоксии, отягощенной введением 3-НПК в течение 6 суток после перенесенной гипоксии.

Начиная с 3-го дня после гипоксического эпизода у животных после ежедневного введения 3-НПК (30 мг/кг массы) выявлялись специфические неврологические нарушения и потеря веса. В группе животных, получавших в реабилитационном периоде одновременно с 3-НПК карнозин (100 мг/кг массы), на протяжении эксперимента двигательная активность была выше, а неврологическая симптоматика – ниже, чем в контрольной группе животных, получавших одновременно с 3-НПК физиологический раствор. При этом было от-

мечено существенное снижение смертности животных – до 8% против 33% в контрольной группе. Введение карнозина способствовало сохранению активности МАО В. Важное значение для улучшения антиоксидантного статуса мозга имеет наблюдавшееся при введении карнозина существенное (на 30%) повышение активности супероксиддисмутазы митохондрий. Защитное действие карнозина, по нашему мнению, обусловлено как его прямым антиоксидантным эффектом, так и восстановлением эндогенной системы антиоксидантной защиты.

Защитные эффекты карнозина на модели 3-сосудистой ишемии мозга у крыс линии Вистар при введении 3-НПК в период 6-суточной реперфузии

Полученные выше данные согласуются и с эффектом карнозина при его применении на модели 3-сосудистой ишемии мозга у крыс линии Вистар, в которой 3-НПК использовалась в период 6-суточной реперфузии. В результате у крыс, получавших 3-НПК (30 мг/кг массы, со 2-го по 6-й день), начиная с 3-х суток после ишемической атаки, развивались неврологические нарушения, выраженность которых у животных с систематическим введением карнозина была в 3 раза меньше, чем у животных, получавших вместо карнозина физиологический раствор. По окончании эксперимента (на 6-е сутки) мозг животных был использован для определения продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой и оценки устойчивости к перекисному окислению. Карнозин препятствовал нарастанию гидроперекисей липидов в ткани мозга за счет усиления эндогенной антиоксидантной защиты. Эти данные свидетельствуют о том, что карнозин способен компенсировать дефицит в антиоксидантной защитной системе мозга, вызванный ишемическим повреждением. Использование этого экспериментального подхода позволило нам впервые продемонстрировать защитное нейропротекторное действие природного дипептида карнозина как лекарственного средства *in vivo* в виде курсового лечения в течение продолжительного реперфузионного периода после ишемического повреждения мозга.

Применение стромальных клеток жировой ткани человека для компенсации неврологического дефицита у крыс, вызванного введением 3-НПК

Новые подходы к лечению нейродегенеративных заболеваний связывают с клеточными технологиями, поз-

воляющими трансплантировать стволовые клетки (СК) в соответствующие отделы пораженного мозга. К числу потенциально возможных источников стволовых клеток для нейротрансплантации во взрослом организме относятся нейральные стволовые клетки мозга, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга, ММСК жировой ткани, клетки обонятельного эпителия.

В центре нашего внимания находилась оценка способности ММСК жировой ткани человека (выделенных из донорского липоаспирата, обедненного зрелыми адипоцитами), дифференцированных к нейрональному фенотипу с помощью ретиноевой кислоты [10], улучшать состояние организма и восстанавливать функциональную активность мозга крыс линии Вистар на фоне интраперитонеального введения 3-НПК (30 мг/кг массы в день) в течение 7 суток. По окончании этого периода половине животных (под нембуталовым наркозом) вводили в правый желудочек мозга суспензию ММСК жировой ткани человека однократно с помощью стереотаксического аппарата в количестве 300–500 тыс. клеток. Контрольной группе животных вводили соответствующий объем раствора Хенкса. В работе оценивалось терапевтическое влияние ММСК на неврологические, поведенческие и нейрогистологические характеристики мозга животных.

В отличие от животных контрольной группы, крысы, получавшие 3-НПК, характеризовались наличием неврологической симптоматики. Этот показатель был менее выражен и быстрее снижался после отмены 3-НПК у животных, получивших ММСК. На 21-е сутки после введения дифференцированных ММСК жировой ткани человека симптоматика животных, получивших 3-НПК, была приблизительно в 2 раза более выраженной, чем у животных получивших 3-НПК вместе с ММСК жировой ткани (рисунок 1А).

По данным теста Морриса, 3-НПК существенно подавляла способность животных к обучению (длина пути крысы в бассейне увеличивалась в среднем с 5 до 9 м), в то время как ММСК практически полностью восстанавливали ее. При этом животные, получавшие ММСК, отличались более высокой скоростью плавания. Результаты, полученные в ходе оценки поведения крыс в тесте Морриса, свидетельствуют о том, что в мозге крыс, получивших ММСК, репарационные процессы происходят более эффективно (рисунок 1Б).

В тесте «открытое поле» на 28-е сутки эксперимента (21-е сутки после введения ММСК) при проведении

количественной оценки исследовательской и двигательной активности животных (рисунки 1В и 1Г) оказалось, что введение 3-НПК в большей степени затрагивает исследовательскую активность (чем двигательную), подавляя ее в 4–6 раз. Введение в желудочек мозга клеток жировой ткани значительно (в 2 раза) восстанавливает исследовательскую активность (хотя из-за индивидуальных различий этот эффект был практически недостоверным), но не влияет на двигательную активность животных.

Данные нейрогистологических исследований свидетельствуют о том, что инъекция крысам 3-НПК приводит к выраженным патоморфологическим изменениям в мозге. Форма нейронов хвостатого ядра интактных крыс больше напоминала круг, чем эллипс. Под влиянием 3-НПК тела нейронов крыс приобретали вытянутую форму, и их размер уменьшался почти в 2 раза. При этом цитоплазма нейронов резко истончалась и бледно окрашивалась, а окраска кариоплазмы усиливалась, поэтому ядра нервных клеток были довольно темными. Оболочка ядра утолщалась в результате повышенного скопления зерен хроматина по её периметру. В ядре определялись 2–3 мелких ядрышка. Вокруг большинства тел нейронов и капилляров наблюдались зоны отека. Нейропилль напоминал неровную крупнопетлистую сеть, вероятно, вследствие отека вокруг отростков нейронов. Клетки нейроглии интенсивно окрашивались, и их форма отличалась полиморфностью. Следовательно, 3-НПК вызывала деструктивные изменения в нервной ткани хвостатого ядра.

Под влиянием ММСК размер нейронов хвостатого ядра увеличивался, и они принимали округлую форму. Увеличивалась и площадь цитоплазмы нейронов. В ядре выявлялись несколько укрупненных ядрышек и зерна хроматина, располагающиеся в виде нитей. Кариоплазма окрашивалась слабо. В цитоплазме нейронов хорошо различались зерна хроматофильной субстанции. Окраска и форма клеток нейроглии указывали на ослабление её реактивности. Таким образом, под влиянием ММСК патоморфологические изменения в хвостатом ядре головного мозга крыс, вызванные 3-НПК, редуцировались.

Данные, полученные методом компьютерной морфометрии, применяемом нами для анализа нейрогистологических изменений [6], согласуются с этим заключением.

Таким образом, под влиянием ММСК у животных не только нормализовались клинические проявления моделируемых расстройств, но и существенно восстанавливалась способность к обучению. Нормализация клинико-физиологических показателей сопровождалась улучшением нейростологических показателей хвостатого ядра, входящего в состав nigrostriарного комплекса головного мозга. Данные морфометрии продемонстрировали нормализацию не только размеров тел нейронов, но и формы тел нейронов хвостатого ядра. Все это указывает на эффективность действия трансплантата ММСК. Описанная модель может являться перспективным подходом к исследованию механизмов лекарственного эффекта стволовых клеток в условиях *in vivo*.

Влияние карнозина на развитие физиологических и биохимических характеристик мозга мышей при МРТР-индуцированном паркинсонизме

Экспериментальные исследования, проведенные на модели МРТР-индуцированного паркинсонизма у мышей с генетически запрограммированным ускоренным темпом старения (Senescence Accelerated Mice, линия *prone 1 – SAM1*), показали, что у мышей, которым вводили нейротоксин МРТР (N-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), было обнаружено снижение двигательной активности и развитие ригидности, причем эти нарушения проявлялись сильнее, чем у мышей линии *SAMR1*, характеризующихся нормальным темпом старения. Введение одновременно с МРТР карнозина (100 мг/кг массы, ежедневно) обеспечивало эффективную защиту мозга от действия МРТР, снижая гибель животных, улучшая их физиологические характеристики, облегчая тяжесть неврологической симптоматики. Карнозин препятствовал накоплению гидроперекисей липидов и белковых карбониллов в мозге мышей *SAM1*, получавших МРТР, а также нормализовал активность MAO B и Cu,Zn-СОД, обеспечивающих поддержание окислительного и ионного гомеостаза мозга [8]. В целом, карнозин может рассматриваться как эффективный природный препарат, защищающий мозг от нейродегенеративных повреждений, вызываемых МРТР.

Карнозин повышает эффективность лекарственной терапии при лечении болезни Паркинсона

Полученные данные указывают на возможность эффективного использования карнозина в качестве препарата, ослабляющего накопление нейродегенератив-

ных изменений у человека в условиях окислительного повреждения мозга. Впервые нами была сделана попытка оценить действие карнозина на клинические и нейрхимические проявления болезни Паркинсона (дрожательно-ригидная и дрожательная форма; стадия заболевания 1,5–2,5 по шкале Хен-Яра). Неврологическая оценка пациентов проводилась в нейрогенетическом отделении Научного центра неврологии РАМН (Г.Х. Багыева, И.А.Иванова-Смоленская, С.Н. Иллариошкин).

До начала проведения лекарственной терапии больные были разделены на 2 группы, сопоставимые по возрасту, длительности заболевания и выраженности неврологических симптомов заболевания (базисная терапия – группа 1, 16 пациентов; базисная терапия в сочетании с севитином – группа 2, 20 пациентов). Пациентам, включенным во 2-ю группу, давали карнозин в виде биологически активной пищевой добавки «Севитин» (Медтехника, Россия) по 2 таблетки 3 раза в день (суточная доза 1,5 г).

Клинические изменения. В обеих группах больных уровень неврологической симптоматики на начальный момент исследования по шкале UPDRS составлял 39 баллов. Через 30 дней лечения в обеих группах пациентов произошло достоверное снижение неврологической симптоматики. В группе больных, получавших базисную терапию, суммарный балл составил $32,5 \pm 2,0$, тогда как в группе больных, получавших дополнительно к базисной терапии севитин – $24,9 \pm 2,1$. Процент улучшения суммарного балла по шкале UPDRS у пациентов, дополнительно получавших севитин, был достоверно выше (36%) относительно пациентов, получавших базисную терапию (16,4%). Анализ состояния пациентов в динамике проводимого лечения выявил определенные закономерности. В результате проведенного лечения у больных обеих групп отмечалось улучшение двигательной активности, которое было более выражено у пациентов, получавших севитин (базисная терапия – на 24,4%, $p=0,001$; базисная терапия + севитин – на 32%, $p=0,007$). Эти улучшения проявлялись в уменьшении одного из наиболее значимых клинических проявлений паркинсонизма – гипокинезии, выявляемых тестами «пронация-супинация», «движения в стопе», «движение кистей рук». В то же время, по тесту «проба с постукиванием пальцев» улучшения имели место у пациентов обеих групп в одинаковой степени. У пациентов обеих групп отмечалось снижение других существенных клинических проявлений паркинсонизма –

ригидности (выявляемой в верхних и нижних конечностях) и тремора, причем применение севитина способствовало более выраженному улучшению моторных функций. Субъективная оценка эффективности лечения, определяемая по тесту «повседневная активность», также выявила некоторое преимущество лечения, включающего севитин (улучшение на 30% против 16% в группе пациентов, получавших базисную терапию). Севитин отличался хорошей переносимостью, побочных эффектов отмечено не было.

Оценка окислительного статуса пациентов. Введение в протокол лечения севитина значительно увеличивает уровень антиоксидантного статуса организма. Важным обстоятельством явилась выявленная отчетливая положительная корреляция ($r = 0,52$) возрастания активности СОД со снижением неврологической симптоматики. Полученные данные позволяют рекомендовать введение севитина в схемы лечения болезни Паркинсона, по крайней мере, тех ее форм, которые были исследованы в настоящей работе.

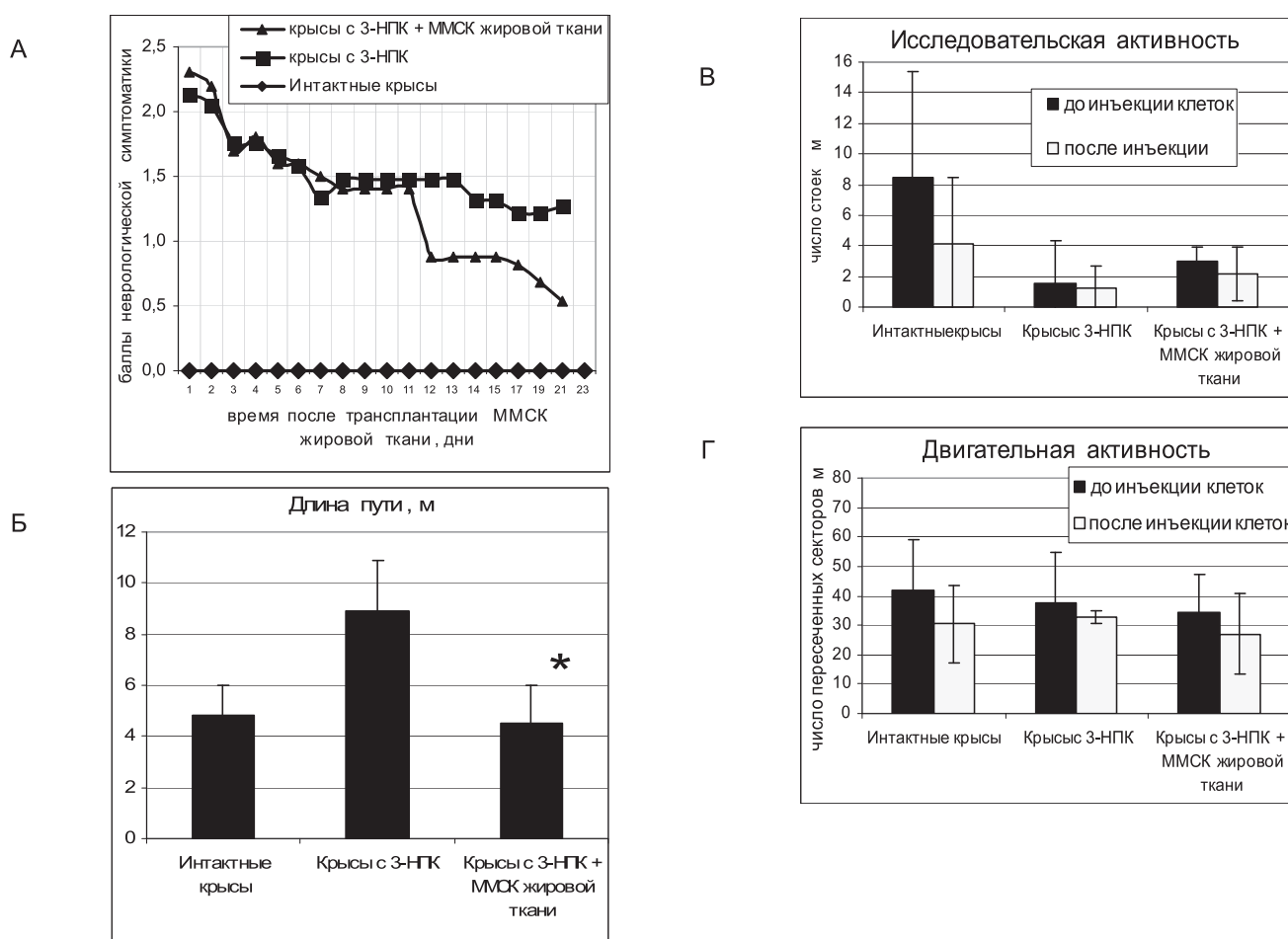


Рисунок 1. А – динамика неврологической симптоматики у крыс 3 групп: контроль (интактные животные, группа 1), после 7-дневного внутрибрюшинного введения нейротоксина 3-НПК (группа 2) и после внутрижелудочкового введения дифференцированных ММСК жировой ткани человека на фоне 7-дневного действия 3-НПК (группа 3); Б – результаты тестирования поиска платформы крысами на 3-й день обучения в тесте Морриса (представлена длина пути плавания крыс, м), В и Г – поведенческие характеристики крыс в тесте «открытое поле» до введения ММСК и на 21-й день после их введения. Данные представлены в виде: среднее \pm стандартное отклонение; * – $p < 0,05$ по отношению к группе 3-НПК (на 21-й день).

Работа выполнена при поддержке гранта Федерального агентства по науке и инновациям РФ (№ 02.512.11.2056) и гранта РФФИ (№ 07.04.00.755).

Литература

1. Болдырев А.А. Карнозин и защита тканей от окислительного стресса. М.: Изд. Московского Университета «Диалог», 1999.
2. Дамулин И.В. Постинсультные двигательные нарушения. *Consilium Medicum* 2002; 2: 64–70.
3. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
4. Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Ключников С.А. и др. Пластичность мозга и молекулярные основы нейродегенеративных заболеваний. В сб.: Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Структурно-функциональные, нейробиохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга». М., 2007: 263–267.
5. Федорова Т.Н., Стволинский С.Л., Доброта Д., Болдырев А.А. Терапевтическое действие карнозина при экспериментальной ишемии мозга. *Вопр. биол. мед. фарм. хим.* 2002; 1: 41–44.
6. Худоерков Р.М., Доведова Е.Л., Воронков Д.Н. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2007; 7: 39–41.
7. Boldyrev A. A. Protection of proteins from oxidative stress: a new illusion or a novel strategy? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1057: 1–13.
8. Boldyrev A.A., Fedorova T.N., Stvolinsky S.L. et al. Chemical intervention in senescence-accelerated mice metabolism for modeling neurodegenerative diseases: an overview. In: Y.Nomura (ed.) *The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence* Elsevier, 2004: 109–115.
9. Ischiropoulos H., Beckman J. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 163–169.
10. Kulikov A., Eva A., Kirch U., Boldyrev A. Scheiner-Bobis G. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1768: 1691–1702.

Цитохимическая оценка нарушений клеточной энергетики при нейродегенеративных заболеваниях

*М.В. Ершова, Е.В. Полевая, В.С. Сухоруков, И.А. Иванова-Смоленская,
С.Н. Иллариошкин*

Научный центр неврологии РАМН, МНИИ педиатрии и детской хирургии Росздрава (Москва)

В последние десятилетия были достигнуты существенные успехи фундаментальных нейробиологических наук в понимании процессов выживания и гибели нейронов, развитии представления о роли эксайтотоксичности и окислительного стресса как единых механизмов повреждения клетки при нейродегенеративных заболеваниях [11, 10]. Детальное изучение клеточной энергетики при нейродегенерациях способствовало не только открытию «новых» (хотя и давно известных) первичных митохондриальных болезней, таких как атаксия Фридрейха (АФ), но и значительно расширило знания о так называемой вторичной митохондриальной патологии и, в частности, роли митохондриальных нарушений в патогенезе распространенных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона (БП).

Неуклонное прогрессивное течение указанных заболеваний, недостаточная эффективность терапии, ухудшение качества жизни пациентов по мере прогрессирования болезни, а также выраженная инвалидизация, степень которой резко возрастает с увеличением тяжести заболевания — все это превращает данную группу болезней в серьезную социальную проблему.

В связи с этим исследования, имеющие целью комплексный анализ митохондриальных функций и эффективности окислительного фосфорилирования при наиболее тяжелых и распространенных нейродегенеративных заболеваниях важны как с теоретической, так и практической точки зрения. Более того, в связи с ключевой ролью поражения митохондриального белка фратаксина в патогенезе АФ, значимостью митохондриальной функции в модулировании клинических проявлений БП, необходимостью проведения адекватного биохимического мониторинга за состоянием больных, а также в связи с принципиальной возможностью эффективной лекарственной коррекции нарушений клеточного энергообмена, в настоящее время остро

стоит вопрос о разработке информативных методов исследования митохондриальной функции. Поскольку одним из ключевых признаков митохондриальной недостаточности является нарушение активности окислительно-восстановительных ферментов, их исследование было выбрано в качестве основы для данной работы.

Атаксия (болезнь) Фридрейха — тяжелое нейродегенеративное аутосомно-рецессивное заболевание, представляющее собой наиболее часто встречающуюся форму наследственных атаксий. Предположения о роли митохондриальных нарушений в патогенезе АФ высказывались еще в 80-е годы XX века А. Varbeau и его школой [2]. Они основывались на том, что классическая клиническая картина АФ складывается из своеобразной комбинации симптомов, которая обычно свойственна митохондриальным энцефаломиопатиям (поражение ЦНС, сердечной мышцы, поджелудочной железы, органа зрения и т.д.).

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о ключевой роли белка фратаксина в регуляции митохондриального транспорта железа [4, 7, 8]. Нарушение функции фратаксина в результате мутаций в гене *X25 (FRDA)* сопровождается повышением содержания железа в митохондриях, снижением резистентности к окислительному стрессу и окислительным повреждением митохондрий, снижением синтеза АТФ и нарушением энергетического метаболизма клетки [5, 9]. Важное значение в патогенезе болезни придается также развивающейся недостаточности Fe-S-зависимых субъединиц ферментов дыхательной цепи митохондрий [6]. С современных позиций АФ рассматривается как особая разновидность митохондриальной болезни, обусловленная повреждением ядерного гена.

Вторичная митохондриальная недостаточность имеет место при ряде нейродегенеративных заболева-

ний, в частности при БП. Нарушение энергетического обмена в виде дефицита комплекса I дыхательной цепи митохондрий (NADH-CoQ-редуктазы) в образцах черной субстанции больных БП было выявлено A. Schariga с соавторами в 1989 г.: дефицит активности составил ~35% от возрастной нормы [10]. В последующем исследователи установили, что снижение активности электрон-транспортной цепи митохондрий при БП имеет системный характер: нарушения окислительного фосфорилирования митохондрий были выявлены также в ряде других тканей больных БП – в тромбоцитах, лимфоцитах, мышцах [10, 13, 14].

Цель работы

Целью данной работы явился цитохимический анализ нарушений в системе митохондриального окислительного фосфорилирования лимфоцитов у пациентов с нейродегенеративной патологией (АФ, БП), а также выявление взаимосвязи этих нарушений с характером течения заболевания.

Пациенты и методы исследования

Было обследовано 34 пациента с диагнозом АФ. Их средний возраст составил $24,4 \pm 12,5$ лет (от 7 до 59 лет). Диагноз устанавливался на основе характерной клинической картины и обнаружения характерной мутации – экспансии GAA-повторов в гене *FRDA* при проведении прямой ДНК-диагностики. В 2 сформированные группы сравнения вошли: а) 14 пациентов сопоставимого возраста с дегенеративными спорадическими атаксиями другого генеза; б) 15 больных с аутосомно-доминантными спиноцеребеллярными атаксиями. Контрольная выборка была сформирована из 28 практически здоровых людей возрастной группы, сходной с группой выявленных пациентов с АФ.

Также было обследовано 40 пациентов с разными формами БП. В контрольную группу вошли 15 клинически здоровых людей, средний возраст которых составил $63,6 \pm 4,2$ лет. Диагноз БП устанавливался на основании стандартных критериев, предложенных Hoghes и соавт. (1992). Для более детального анализа выявляемых изменений все пациенты с БП были разделены на 2 группы. В первую группу вошли больные, не получавшие леводопа-содержащие препараты ($n=31$), средний возраст $63,3 \pm 7,8$ года. Вторую группу составили пациенты с БП, получавшие леводопа-содержащие препараты ($n=31$), средний возраст $65,8 \pm 8,2$ года.

Системная оценка энергетического метаболизма у обследованных больных АФ и БП проводилась путем определения активности ферментов тканевого дыхания – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), α -глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ), глутаматдегидрогеназы (ГДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) в лимфоцитах периферической крови с использованием цитохимического метода Р.П.Нарциссова [1]. В данном методе ферментативная активность выражается в условных единицах, соответствующих среднему числу гранул формазана, являющемуся продуктом цитохимической реакции. У 7 больных АФ и у 10 больных БП, помимо этого, проведен анализ ферментного статуса лимфоцитов с помощью метода компьютерной телеметрии с использованием диагностической системы, состоящей из персонального компьютера высокой мощности со специальным пакетом морфометрических программ «Видео-тест Авто 4.0» (Санкт-Петербург) и светового микроскопа с цифровой видеокамерой. Оценивались следующие параметры: количество и площадь депозитов формазана, интервал яркости, оптическая плотность, эллипс и др.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета программ STATISTICA (StatSoft Inc. 1993, USA).

Результаты и обсуждение

Исследование ферментативного статуса лимфоцитов было проведено 21 больному АФ и всем лицам групп сравнения и контроля. При изучении активности СДГ лимфоцитов в группе АФ у пациентов были выявлены разнонаправленные изменения, что позволило разделить эту группу на 2 подгруппы: АФ-1 – пациенты с пониженной активностью дегидрогеназ ($n=15$, т.е. большинство больных) и АФ-2 – с повышенной активностью СДГ, ЛДГ и МДГ ($n=6$) – таблица 1.

Статистически значимое снижение активности ключевого митохондриального фермента СДГ, выявленное нами у 71% больных АФ, свидетельствует о выраженном системном нарушении биоэнергетических процессов при данном заболевании. Примечательно, что в группах сравнения показатели активности СДГ не отличались от значений в контрольной группе. Это говорит об отсутствии системных нарушений клеточной энергетики при дегенеративных атаксиях другого генеза и о том, что патогенетические механизмы развития этих заболеваний значительно отличаются от механизмов развития АФ. При анализе данных не было получено кор-

Таблица 1. Результаты цитохимического анализа активности митохондриальных ферментов

Ферменты	Группы обследуемых				
	АФ-1	АФ-2	Другие спорадические дегенеративные атаксии	Аутосомно-доминантные атаксии #	Контроль
СДГ	14,8* [11,05; 17,05]	21,7* [20,1; 22,55]	19,4 [18,5; 19,8]	22,65 [20,8; 23,3]	19,18 [18,8; 19,4]
ГФДГ	6,4* [5,4; 10,05]	8,5* [5,8; 8,82]	9,8□□ [7,75; 11,9]	11,25 [6,85; 13,1]	12,38 [11,43; 13,25]
ГДГ	8* [4,2; 10]	11,76 [5,8; 14,96]	11□ [9,4; 13,6]	9,25 [5,95; 12,05]	13,4 [11,8; 14,45]
ЛДГ	13,15 [9,5; 17,6]	20,35* [11; 20,57]	16,1□□ [14,3; 16,5]	–	12,35 [11,8; 14,03]
МДГ	9,6** [8; 11,5]	16,3*** [11,6; 18,3]	–	–	12,6 [11,8; 14]

Примечание: Числовые значения в таблице отражают ферментативную активность в условных единицах, соответствующих среднему числу гранул формазана – продукта цитохимической реакции. Статистически значимое различие с контрольной группой: * – $p < 0,0001$; ** – $p = 0,0004$; *** – $p = 0,01$; □ – $p = 0,02$; □□ – $p = 0,002$. # – Для группы аутосомно-доминантных атаксий (более позднее начало болезни) достоверность различий оценивалась в сравнении с самостоятельным возрастным контролем

реляций между числом GAA-повторов (т.е. степенью генетического дефекта), тяжестью состояния по клинической шкале, продолжительностью заболевания и степенью снижения активности СДГ, что свидетельствует о сложности и многоступенчатости биохимических нарушений, приводящих к системному дефекту метаболизма. Активность большинства других исследованных ферментов (ГФДГ, ГДГ, МДГ) в подгруппе АФ-1 была также значимо ниже, чем в контроле (таблица 1).

Особого внимания заслуживает факт достоверного повышения средней активности СДГ по сравнению с контролем у части больных АФ. Это может быть расценено как мобилизация энергетических ресурсов благодаря ускорению окисления сукцинатов; очевидно, однако, что в такой ситуации деятельность организма протекает при полной мобилизации функционального резерва, что в конечном счете может привести к истощению метаболических функций. Аналогичная закономерность в данной подгруппе больных наблюдалась и для других ферментов (см. таблицу 1), причем уровень ЛДГ и МДГ в группе АФ-2 оказался выше контрольных цифр ($p = 0,01$). Данная группа пациентов отличалась от основной группы пациентов с АФ значимо более высоким числом GAA-повторов ($p = 0,03$), более ранним дебютом заболевания ($p = 0,04$), более высоким уровнем лактат-ацидоза в крови ($p = 0,05$) и более низким уровнем собственной антиоксидантной защиты ($p = 0,02$).

При проведении компьютерной телеметрии в группе

АФ были выявлены следующие морфометрические особенности:

- 1 У пациентов с АФ по сравнению с контролем выявлено уменьшение числа гранул продукта реакции, более низкая оптическая плотность депозитов и увеличение значения интегральной оптической плотности ($p = 0,04$), что достоверно свидетельствует о патологии энергетического метаболизма в митохондриях.
- 2 В процентном отношении у пациентов с АФ отмечалось более высокое содержание кластеров («кластеризация» гранул) по сравнению с контролем, что является признаком «напряжения» энергетического метаболизма. Имелась тенденция к увеличению площади кластеров с нарастанием тяжести заболевания в клинической картине. В контрольной группе «кластеризация» гранул выражена значительно меньше, что свидетельствует о «покое» клетки в условиях эффективного и достаточного окислительного фосфорилирования.
- 3 Выявлено уменьшение количества мелких гранул и значения эллипса в исследованных клетках по сравнению с контролем, что является признаком дисбаланса митохондриального метаболизма.

У больных БП в результате проведенного исследования было установлено, что степень изменения морфометрических параметров активности митохондрий кор-

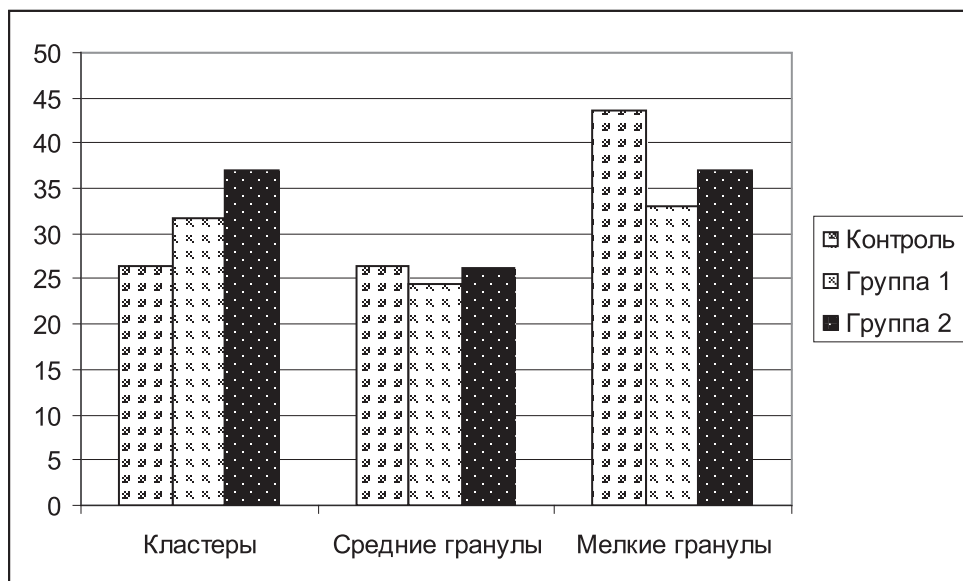


Рисунок. Распределение депозитов СДГ в исследованных группах БП (по результатам компьютерной телеметрии)

Примечание: столбцы отражают размеры гранул, выявленных с помощью морфометрической методики. Контроль — пожилые лица, возраст которых составил $63,6 \pm 4,2$ лет; группа 1 — пациенты с БП, не получавшие леводопы-содержащей терапии; группа 2 — пациенты, получавшие препараты леводопы.

релирует с тяжестью и длительностью течения заболевания во всех обследованных группах пациентов. Выявленные изменения у больных БП, не получавших и получавших леводопу, по сравнению с одновозрастным контролем проявлялись в виде значительного снижения количества гранул и изменения их качественных параметров (увеличение площади средних гранул и кластеров, округление гранул, повышение оптической плотности), что свидетельствует о глубоком нарушении функции митохондрий (рисунок).

Наибольшие изменения были обнаружены у пациентов второй группы, получавших препараты леводопы. Можно предположить, что данные результаты связаны с возможным отрицательным влиянием леводопы на функцию митохондрий. Однако следует учесть, что пациенты второй группы в подавляющем своем числе были старше и имели большую давность болезни и тяжесть заболевания, поэтому полученные данные не могут служить прямым подтверждением «токсичности» леводопы (прямых доказательств этому в настоящее время нет). У пациентов второй группы было выявлено статистически значимое абсолютное снижение количества митохондрий при относительном повышении процесса кластерообра-

зования — патологического скопления большого количества гранул (митохондрий). Конгломераты митохондрий компенсаторно разрастались, с одновременным повышением ферментной активности в каждой отдельной митохондрии за счет увеличения оптической плотности депозитов. Схожие процессы наблюдались и у пациентов первой группы, но в менее выраженной степени.

Полученные данные свидетельствуют о глубоком нарушении функции митохондрий и системной декомпенсацией энергетического обмена у пациентов с нейродегенеративной патологией (АФ, БП) в исследованных группах. Наши результаты ещё раз подтверждают митохондриальную природу АФ и доказывают, что нарушения митохондриальной функции являются одним из ключевых звеньев в патогенезе БП. Это может служить основанием для назначения лекарственных средств, влияющих на разные уровни энергетического метаболизма и функционирование электронной цепи митохондрий (препараты янтарной кислоты, коэнзим Q10, идебенон, L-карнитин и др.), а также для внедрения в практику нового эффективного метода цитохимического мониторинга течения болезни.

Литература

1. Нарциссов Р.П. Анализ изображения клетки — следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии. Педиатрия 1998; 4: 101–105.
2. Barbeau A. The Quebec cooperative study of Friedreich's ataxia: 1974–1984 — 10 years of research. Can. J. Neurol. Sci. 1984; 11: 646–660.
3. Benecke R., Strumper P., Weiss H. Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes. Brain 1993; 116: 1451–1463.

- 4 Bidichandani S.I., Ashizawa T., Patel P.I. Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60: 1251–1256.
- 5 Cossee M., Durr A., Cavalcanti F. et al. Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 200–206.
- 6 Foury F. Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett.* 1999; 456: 281–284.
- 7 Gray J.V., Johnson K.J. Waiting for frataxin. *Nat. Genet.* 1997; 16: 323–328.
- 8 Pandolfo M. Molecular basis of Friedreich's ataxia. *Mov. Disord.* 2001; 16: 815–821.
- 9 Puccio H., Koenig M. Recent advances in molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 887–892.
- 10 Schapira A.H.V. Cooper J.M., Dexter D. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1366: 225–233.
- 11 Schapira A.H.V. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochem. Biophys. Acta* 1999; 1410: 159–170.
- 12 Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J. et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 4904–4911.
- 13 Shoffner J.K., Watts R.L., Juncos J.L. et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1991; 30: 332–339.
- 14 Yoshino H., Nakagawa-Hattori Y., Kondo T., Mizuno Y. Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 1992; 4: 27–34.

Иммунохимические особенности патогенеза болезни Паркинсона

В.В. Полещук, С.Г. Морозов, И.А. Иванова-Смоленская, А.В. Карабанов

Научный центр неврологии РАМН, НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (Москва)

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, в основе которого лежат необратимые повреждения и гибель nigrostriatalных дофаминсинтезирующих нейронов. Несмотря на то, что изучению данного заболевания уделяется большое внимание, многие вопросы, касающиеся патогенеза БП, остаются нерешенными.

В последнее время появляется все больше данных об участии иммунной системы в нейродегенеративном процессе при БП. В то же время конкретная роль иммунных механизмов в этих процессах до конца не ясна. Некоторые авторы считают, что изменения в иммунной системе, выявляемые при БП, носят неспецифический характер и вторичны по отношению к дофаминовому истощению в мозге [3, 5, 8, 14]. В то же время имеется и другая точка зрения, согласно которой иммунные изменения при БП имеют первичный характер [13].

Иммунные нарушения при БП затрагивают как клеточное, так и гуморальное звено иммунитета. Количество Т-клеток (CD3+) и В-клеток (CD19+) при БП уменьшено. Особенно страдает CD4+ популяция (Т-хелперы) [7, 12]. Наблюдается изменение уровней провоспалительных цитокинов в ликворе больных БП и в сыворотке крови [6, 7, 12]. В то же время, практически не проводились исследования уровней антител к провоспалительным цитокинам при данном заболевании.

Повышенное антителообразование к белкам нервной ткани, нейротрансмиттерам может усугублять нейродегенеративные процессы в головном мозге. Показано, что по мере прогрессирования патологического

процесса, когда происходит прорыв гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) и выход нейроантигенов в кровь, происходит специфическая активация лимфоцитов мозговыми антигенами и возникают условия для массивного проникновения лимфоцитов и аутоантител в мозг [1, 10]. Широко обсуждается роль антител к дофамину, серотонину, а также тканевым структурам хвостатого ядра мозга в возникновении и прогрессировании патологического процесса при БП [2, 9, 15].

Несмотря на наличие работ, посвященных изучению уровней нейроантигенов в крови при нейродегенеративных заболеваниях, в частности, при БП [1], почти отсутствуют данные об измерении уровней сывороточных антител к нейроспецифическим белкам и их роли в развитии данного заболевания. Особый интерес представляет не только изучение уровней α-АТ (или идиотипических антител), но и антиидиотипических антител (АИАТ) к нейроантигенам, а так же состояние идиотип-антиидиотипического равновесия.

Для глубокого целостного понимания иммунологических механизмов, вовлеченных в патогенез БП, необходимо комплексное изучение иммунных нарушений, возникающих при данном заболевании.

Цель исследования

Целью данной работы было комплексное изучение уровней антител к нейроспецифическим белкам S-100β, GFAP и фактору роста нервов (ФРН) при БП и поиск возможных клиничко-иммунологических корреляций (взаимосвязь между выявляемыми уровнями антител и

длительностью болезни, возрастом пациентов, тяжестью неврологической симптоматики и длительностью леводопа-терапии).

Пациенты и методы исследования

Группа больных БП составила 87 человек (48 мужчин и 39 женщин), возраст от 30 до 89 лет, средний возраст $65 \pm 10,7$ лет. Тяжесть неврологической симптоматики, оцениваемая по шкале UPDRS [11] составила от 32 до 118 баллов (у 42 человек тяжелое течение заболевания, у 40 – средней тяжести, у 5 – легкое течение). Длительность болезни от 1 до 10 лет, средняя продолжительность болезни – 5,4 года. Длительность леводопа-терапии составила от 1 до 7 лет, пятерым пациентам леводопа-терапия не проводилась.

Группу контроля составили 49 здоровых доноров (31 мужчина и 18 женщин) соответствующей возрастной группы (возраст от 38 до 79 лет, средний возраст $61 \pm 11,8$ лет).

Полученные образцы крови консервировали с добавлением азида натрия (0,02%) и хранили при -40°C не более 2 мес., с однократным размораживанием. Для определения уровней антител первого и второго порядка к белкам S-100b, GFAP и ФРН в данной работе применялась оригинальная методика, разработанная С.Г Морозовым (1997) и позволяющая оценить уровень антител сразу к целому комплексу антигенных детерминант белка, в том числе и к «минорным», что может давать более полное представление о нарушениях гуморального иммунитета при БП. Для оценки уровней антител первого и второго порядка применялись тест-системы с иммобилизацией на полистироловые планшеты антиген-специфичных составляющих этой сети, а именно F(ab)₂ –фрагментов соответствующих идиотипов и антиидиотипов.

Результаты

Уровни аутоантител как первого, так и второго порядка ко всем исследуемым белкам у пациентов с БП оказались достоверно выше, чем в группе контроля. Соотношения уровней аутоантител первого и второго порядка к GFAP и ФРН как при БП, так и в группе контроля, в целом близки к единице, что говорит об уравновешенности идиотип-антиидиотипической сети. В то же время имеется тенденция к разбалансировке идиотип-антиидиотипического равновесия аутоантител к белку S100b за счет относительного повышения идиотипических аутоантител.

Нами отмечена связь между повышением уровней а-АТ к белку S100b и тяжестью неврологической симптоматики (по шкале UPDRS) (рис. 1). Имеется достоверная корреляция между тяжестью неврологической симптоматики и соотношением а-АТ/АИАТ к S100b, то есть с уравновешенностью идиотип-антиидиотипической сети. Таким образом показано, что утяжеление неврологической симптоматики сопровождается преимущественным накоплением а-АТ к S100b, в то время как продукция функциональных противовесов (АИАТ) остается на прежнем уровне, т.е. происходит срыв компенсаторной системы идиотип-антиидиотипов. Возможно, что накопление более агрессивных а-АТ при относительном недостатке продукции функциональных противовесов – АИАТ – может вести к утяжелению неврологической симптоматики.

У пациентов с БП нами проведен корреляционный анализ между уровнями а-АТ, АИАТ и их соотношением и тяжестью неврологической симптоматики, длительностью болезни, длительностью леводопа-терапии, возрастом на момент обследования и возрастом начала заболевания. Как видно из данных, приведенных на рисунке 2, несмотря на то, что уровни а-АТ и АИАТ к ФРН у пациентов с БП достоверно выше, чем в группе контроля, не было выявлено связи между изучаемыми параметрами и уровнями а-АТ и АИАТ к ФРН. Не отмечается в отношении данного белка и разбалансировка идиотип-антиидиотипической сети. По-видимому, изменение уровней антител к ФРН не оказывает влияния на течение патологического процесса при БП.

Связь между длительностью болезни и повышением уровней а-АТ к S100b и GFAP недостоверна и имеет лишь характер тенденции. Однако, состояние идиотип-антиидиотипического равновесия уровней антител к этим белкам прямо коррелирует с продолжительностью заболевания. При длительно текущем заболевании повышается соотношение а-АТ/АИАТ к S100b и GFAP за счет повышения уровней а-АТ. По-видимому, это связано с дегенерацией нервной ткани, что ведет к повышению синтеза а-АТ к нейроспецифическим белкам с последующим срывом компенсаторной системы идиотип-антиидиотипов.

Выявляемая тенденция к повышению уровней а-АТ к S100b при длительной леводопа-терапии связана, по-видимому, не только с проводимой терапией, а с тем, что длительность леводопа-терапии практически у всех пациентов, получающих данное лечение, коррелирует с длительностью заболевания.

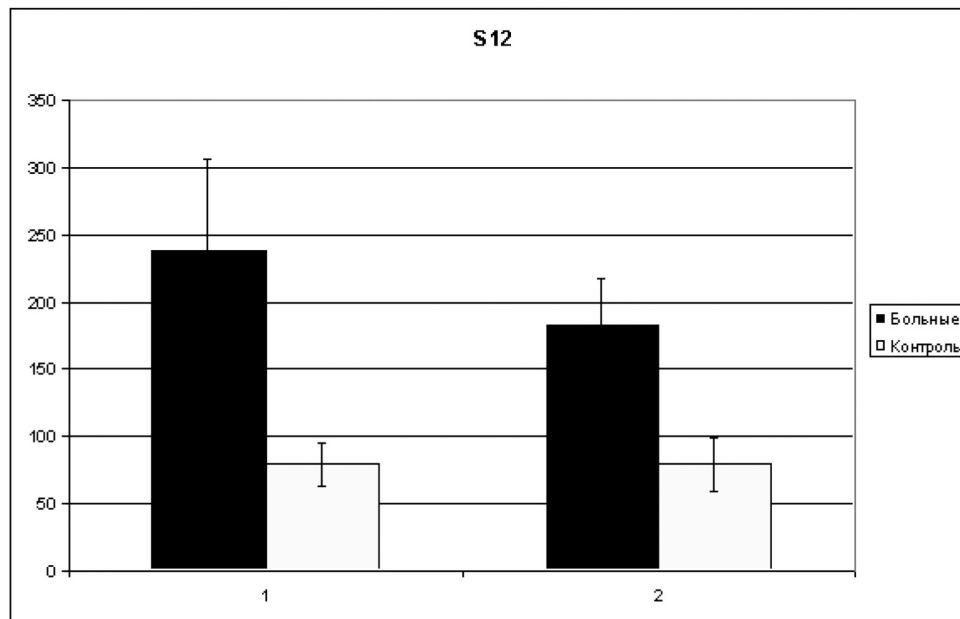


Рисунок 1. Уровни α -АТ и АИАТ к белку S100 при БП и в группе контроля.
1 – α -АТ; 2 – АИАТ; $p < 0,01$.

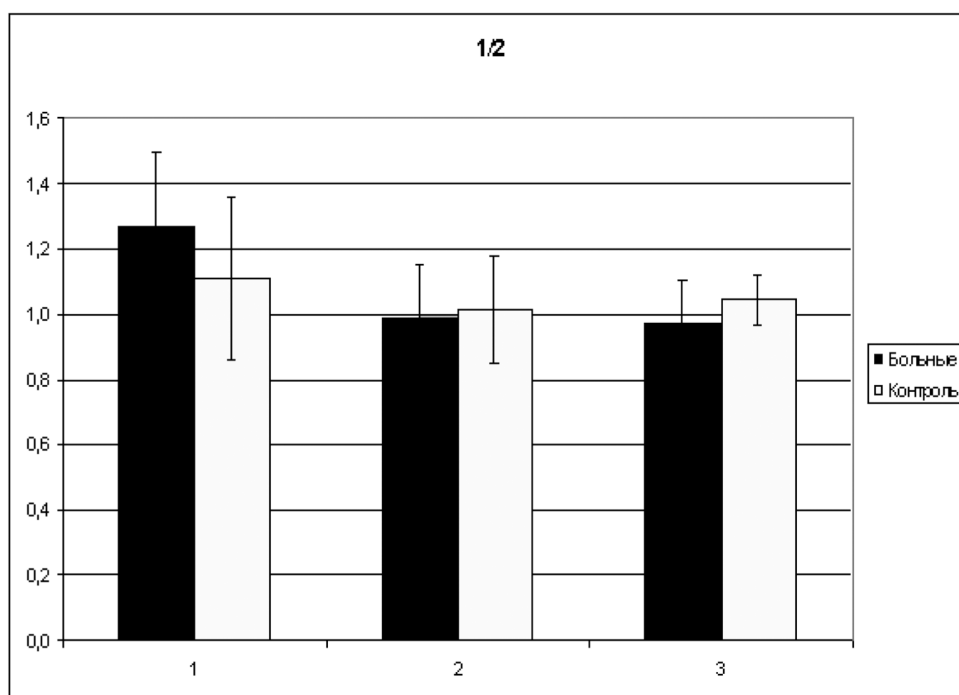


Рисунок 2. Соотношение уровней (уравновешенность) α -АТ и АИАТ при болезни Паркинсона и в группе контроля.
1 – S100; 2 – GFAP; 3 – ФРН; $p < 0,01$.

Не выявлено связи между какими-либо из изучаемых параметров и возрастом пациентов на момент постановки диагноза БП.

Заключение

Таким образом, в настоящей работе показана связь уровней образования а-АТ и АИАТ к S100b и GFAP с некоторыми клиническими параметрами БП. Важно смот-

реть не только уровни а-АТ и АИАТ, но и состояние идиотип-антиидиотипического равновесия уровней АТ, т.к. изменение соотношения а-АТ/АИАТ играет важную роль в характере течения патологического процесса при БП.

Литература

1. Белопасов В.В., Баклаушев В.П., Чехонин В.П. Проницаемость гематоэнцефалического барьера при болезни Паркинсона. Неврология—Иммунология. СПб, 2001: 23–24.
2. Маньковский Н.Б., Карабань И.Н., Крыжановский Г.Н. и др. Антитела к дофамину у больных паркинсонизмом и их возможная роль в патогенезе паркинсонического синдрома. Журн. неврол. и психиатрии им. С.С.Корсакова 1993; 6: 7–10.
3. Морозов С.Г., Гнеденко Б.Б., Панченко Л.Ф. и др. Аутоантитела к белкам ткани мозга при патологии нервной системы. Нейрохимия 1996; 2: 98–102.
4. Морозов С.Г., Грибова И.Е., Полещук В.В. и др. Изменения идиотип-антиидиотипического равновесия с направленностью к белкам нервной ткани S-100 и GFAP при болезни Паркинсона. Нейроиммунология 2003; 2: 99.
5. Морозов С.Г., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. и др. Иммунохимические корреляты тяжести течения болезни Паркинсона. Вопр. мед. химии 1997; 1: 34–38.
6. Учакина О.Н., Учакин П.Н., Мезенцева М.В. и др. Цитокиновый баланс при нейродегенеративных заболеваниях. Цитокины и воспаление 2007; 2: 61–65.
7. Bas J., Calopa M., Mestre M. et al. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. J. Neuroimmunol. 2001; 113: 146–152.
8. Bieganska K., Czlonkowska A., Bidzinski A. et al. Immunological changes in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. J. Neuroimmunol. 1993; 42: 33–37.
9. Chen S., Le W.D., Xie W.J. et al. Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. Arch. Neurol. 1998; 55: 1075–1080.
10. Cz onkowska A., Kurkowska-Jastrzbska I., Cz onkowski A. et al. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide. Med. Sci. Monit. 2002; 8: 165–177.
11. Fahn S., Elton R.L., Members of the UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S., Marsden C.D., Calne D.B., Goldstein M. (eds.) Recent developments in Parkinson's disease. Vol. 2. Florham Park, NJ: McMillan Health Care Information, 1987: 153–163.
12. Fiszer U., Mix E., Fredrikson S. et al. Gamma delta+T cells are increased in patients with Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 1994; 121: 39–45.
13. Gao H.M., Jiang J., Wilson B. et al. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. J. Neurochem. 2002; 81: 1285–1297.
14. Merrill J.E. Microglia: Neural cells responsive to lymphokines and growth factors. Immunol. Today 1987; 8: 146–150.
15. Tanaka K., Nakajima T., Atsumi T. et al. Serum antibodies to brain proteins in a patient with parkinsonism associated with IgM paraproteinemia. Jap. J. Med. 1988; 27: 300–304.

Патогенетические аспекты гипергомоцистеинемии при болезни Паркинсона

*И.В. Литвиненко, М.М. Одинак, О.С. Сологуб, А.А. Сахаровская, В.М. Шмелева
Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова,
НИИ гематологии Минздравсоцразвития России (Санкт-Петербург)*

В 1817 году Джеймс Паркинсон описал заболевание, которому в дальнейшем было присвоено его имя. При этом он ошибочно указал, что чувства и интеллект при этой болезни не страдают. Для такого заключения были веские причины. Во-первых, продолжительность жизни пациентов была не столь большой, как в настоящее время. Во-вторых, ряд лекарственных препаратов (холинолитики), которые стали широко применяться для лечения заболевания значительно позже, как оказалось, негативно влияют на когнитивные функции [1]. Имеются данные о негативном влиянии на Н-холинорецепторы некоторых агонистов дофаминовых рецепторов [15]. В-третьих, патоморфологические и нейро-визуализационные исследования показали

закономерное вовлечение в нейродегенеративный процесс кортико-лимбических структур мозга на поздних стадиях заболевания. В настоящее время трудно переоценить значение внедрения леводопы в терапию болезни Паркинсона (БП) для снижения инвалидности пациентов. Без лечения леводопой 60% больных через 10 лет становятся инвалидами, на фоне терапии процент таких больных составляет около 20%. И сегодня, пожалуй, за редким исключением, нет пациентов на развернутых стадиях болезни, которые не принимали бы эти препараты. Вместе с тем, обозначился целый ряд проблем, которые по своему влиянию на качество жизни пациента и его повседневную активность могут порой выходить на первое место по сравнению даже с двига-

тельными нарушениями. Они включают депрессию, когнитивные нарушения, психотические расстройства, нарушения сна и ряд других [1, 4, 5]

Механизмы формирования когнитивных расстройств и деменции остаются неясными [3, 7, 13]. В последних патоморфологических и нейровизуализационных исследованиях были продемонстрированы тесные взаимоотношения сосудистых и нейродегенеративных изменений мозга при болезни Альцгеймера и сосудистой деменции. Влияние сопутствующей сосудистой патологии при БП также может иметь значение для прогрессирования нейродегенеративного процесса [7, 10, 17]. Поиск механизмов объединяющих нейродегенеративный и сосудистый процессы поможет открыть новые возможности в терапии этих заболеваний.

Особый интерес исследователей привлекает аминокислота гомоцистеин, которая является продуктом деметилирования метионина и при ее избытке представляет собой фактор риска развития сосудистых заболеваний и деменции [2]. Имеются данные о способности гомоцистеина вызывать тоническую стимуляцию NMDA-глутаматных рецепторов головного мозга и запуск всего патологического глутамат-кальциевого каскада [4]. Установлено, что повышенный уровень гомоцистеина положительно коррелирует со степенью кортикальной церебральной атрофии, выраженностью атрофических изменений в гиппокампе [9] и количеством гиперинтенсивных очагов в белом веществе головного мозга [10, 19]. Исследования показали обратно пропорциональную зависимость между увеличением уровня гомоцистеина в плазме крови и низкими показателями по нейропсихологическим шкалам, оценивающим уровень когнитивных функций у пожилых людей без деменции [18]. Оказалось, что у пациентов с БП нередко обнаруживают гипергомоцистеинемию [16, 17]. При этом имеются данные, что терапия леводопой приводит к дальнейшему повышению уровня гомоцистеина за счет метилирования леводопы и дофамина через фермент катехол-О-метилтрансферазу (КОМТ), который катализирует процесс превращения S-аденозилметионина в S-аденозилгомоцистеин [17]. В экспериментальных исследованиях установлено токсическое влияние гомоцистеина не только на нейроны, но и на эндотелий сосудов головного мозга, что существенно повышает риск развития церебральных перфузионных расстройств [18].

На сегодня отсутствуют четкие представления о патогенетическом значении гипергомоцистеинемии на прогрессирование двигательных и когнитивных расстройств при БП. Ряд данных о влиянии повышенного уровня гомоцистеина на когнитивные и эмоциональные нарушения носят достаточно противоречивый характер [16, 17]. В России такие исследования до последнего времени отсутствуют.

Цель и задачи исследования

Цель: установить патогенетическое значение гипергомоцистеинемии при БП.

Задачи: 1) провести скрининговое исследование уровня гомоцистеина в плазме крови у пациентов с различными стадиями БП; 2) оценить у пациентов состояние двигательных и когнитивных функций с использованием комплекса моторных и нейропсихологических шкал; 3) определить уровень гомоцистеинемии на разных стадиях БП и при различной степени выраженности когнитивных нарушений; 4) осуществить многофакторный анализ взаимосвязей между концентрацией гомоцистеина в плазме крови и клинико-демографическими показателями пациентов с БП.

Пациенты и методы исследования

В исследование были включены 102 пациента, соответствующие диагнозу БП по критериям Британского банка мозга. Контрольная группа состояла из 50 человек, не имевших признаков нейродегенеративного заболевания, выраженного сосудистого поражения мозга, психических расстройств и эндокринной патологии, достоверно не отличавшихся по полу и возрасту от пациентов. Больные оценивались по следующим шкалам: двигательные нарушения – по шкале Хен и Яра, унифицированной шкале оценки БП (UPDRS); когнитивные нарушения – по краткой шкале оценки психического статуса (MMSE), батарее лобной дисфункции (FAB), тесту «рисования часов». Уровень общего гомоцистеина определяли методом жидкостной хроматографии под высоким давлением (HPLC). По нашим данным, нормальными показателями уровня гомоцистеина были следующие значения: в возрасте от 30-59 лет у мужчин – 6,3-11,2 ммоль/л, у женщин – 4,5-7,9 ммоль/л; в возрасте старше 60 лет у мужчин и у женщин – 5,8-13,5 ммоль/л. Более полная информация об обследованных пациентах представлена в таблице 1.

Таблица 1.
Клинико-демографические и биохимические показатели обследованных лиц

	БП без деменции (n=44)	БП с деменцией (n=58)	Контрольная группа (n=50)
Возраст (годы)	65,3±10,8 (47-79)	71,4±4,9 (60-79)	68,8±4,3 (60-76)
Длительность болезни (годы)	2,5±1,3	7,8±3,7	Не применимо
Стадия по Хен/Яру	2,4±0,5	2,9±0,8	Не применимо
Количество больных, получающих леводопу	27 (61,3%)	58 (100%)	Не применимо
Доза леводопы (мг/сут)	257,2±267,1	644,7±267,9	Не применимо
Двигательные нарушения по UPDRS, III часть (баллы)	26,8±5,7	41,9±8,3*	Не применимо
MMSE (баллы)	29,1±0,9	23,4±3,5*	29,2±0,8
FAV (баллы)	16,8±1,3	11,8±3,1*	16,9±1,2
Тест рисования часов (баллы)	9,1±1,6	5,9±2,5*	9,2±1,3
Уровень гомоцистеина (мкмоль/л)	12,9±3,3	23,5±12,7*	10,2±3,1

*Примечание: * – p<0,05 при сравнении больных с деменцией и без нее.*

Статистический анализ полученных данных проводился в программе Statistica v. 6.0 с использованием непараметрических критериев (критерий Манна–Уитни, критерий согласия (χ^2)). С целью изучения влияния исследуемых факторов на исследуемую величину (взаимосвязь между рядом клинических, нейропсихологических, лабораторных и демографических показателей пациентов) применяли методы множественного регрессионного и дисперсионного анализа.

Результаты

Повышенный уровень гомоцистеина выявлен у 69 пациентов с БП. В том числе при отсутствии деменции – у 15 человек, при наличии деменции – у 54 пациентов. Средние значения гомоцистеинемии у пациентов, получавших препараты леводопы и у больных, не получавших леводопу, достоверно отличались (19,1±11,5 мкмоль/л и 11,8±3,7 мкмоль/л, соответственно, p=0,00001). Но ни у одного пациента, не принимавшего препараты леводопы, на ранних стадиях болезни не было выявлено гипергомоцистеинемии. Уровень гомоцистеина колебался от 6,4 мкмоль/л до 10,1 мкмоль/л. Это указывает на большую вероятность приобретенного характера данного дисметаболического расстройства,

чем на его причинную роль в развитии БП. В нашем исследовании не было больных на поздних стадиях заболевания, которые бы не принимали препараты леводопы. Определить, каков был бы уровень гомоцистеина при их отмене, не представлялось возможным, так как это привело бы к развитию акинетического криза или тяжелой декомпенсации состояния. При этом у некоторых больных, принимавших препараты леводопы, уровень гомоцистеина был в пределах возрастной нормы. Не получено также корреляционной связи между суточной дозой леводопы и содержанием гомоцистеина в плазме крови, что по-видимому, отражает нелинейный и недозозависимый эффект препаратов на поздних стадиях болезни.

Среди обследованных больных деменция была выявлена у 58 человек. Среднее значение гомоцистеинемии в этой группе достоверно отличалось от среднего уровня гомоцистеина у пациентов с БП без деменции (23,5±6,7 мкмоль/л и 12,9±2,8 мкмоль/л, p<0,05). Самый высокий уровень гомоцистеина (55,9 мкмоль/л) был выявлен у пациента с длительностью болезни около 16 лет, суточная доза леводопы составляла 500 мг. У пациента отмечались частые зрительные галлюцинации, умеренно выраженная деменция.

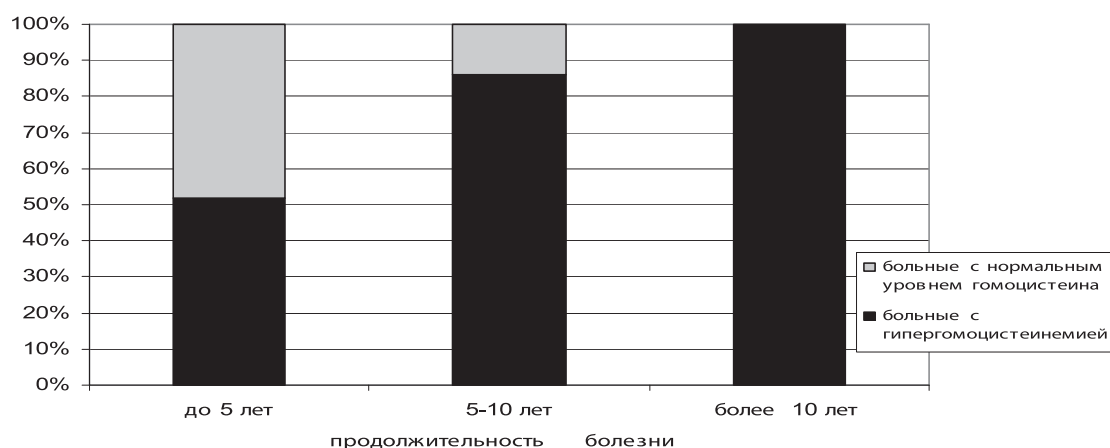


Рисунок 1. Пропорция больных с повышенным уровнем гомоцистеина в плазме крови при различной продолжительности болезни.

Другие взаимоотношения были выявлены между продолжительностью болезни, длительностью приема препаратов леводопы и уровнем гомоцистеина. При стаже болезни более 10 лет гипергомоцистеинемия в нашем исследовании встречалась у 100% обследуемых (рис. 1). Кроме того, установлено, что чем выше стадия заболевания, тем выше уровень гомоцистеина в плазме крови.

Многофакторный регрессионный анализ показал сильную положительную связь между продолжительностью заболевания, длительностью приема препаратов леводопы и уровнем гомоцистеинемии ($r=0,63$; $p<0,001$) (рис. 3). Между гипергомоцистеинемией и показателями нейропсихологического тестирования выявлена сильная отрицательная корреляционная связь: по шкале MMSE – $r=-0,64$, $p<0,001$ (рис. 4); по шкале FAB – $r=-0,59$, $p<0,001$; по тесту рисования часов – $r=-0,35$, $p<0,001$.

Обсуждение

Полученные в работе данные ставят вопрос о своевременной коррекции гипергомоцистеинемии у паци-

ентов на развернутых стадиях БП с целью замедления прогрессирования болезни. Хотя терапия фолиевой кислотой, витаминами В6 и В12, уменьшая выраженность гипергомоцистеинемии, не может обеспечить значимое восстановление когнитивных функций при развернутых стадиях деменции [14], мы полагаем, что снижение повышенного уровня гомоцистеина является патогенетически обоснованным и необходимым компонентом терапии БП. Имеются данные о повышении эффективности терапии ингибиторами холинэстеразы в комбинации с фолиевой кислотой, что сопровождалось также положительными биохимическими изменениями крови. Процент респондеров в группе больных, получавших вместе с ингибитором холинэстеразы фолиевую кислоту, составил 70%, в то время как в группе плацебо – 39% [8]. По всей видимости, диагностика гипергомоцистеинемии должна проводиться на самых ранних сроках БП с последующей своевременной коррекцией этого биохимического нарушения. Одним из направлений профилактики и коррекции может стать

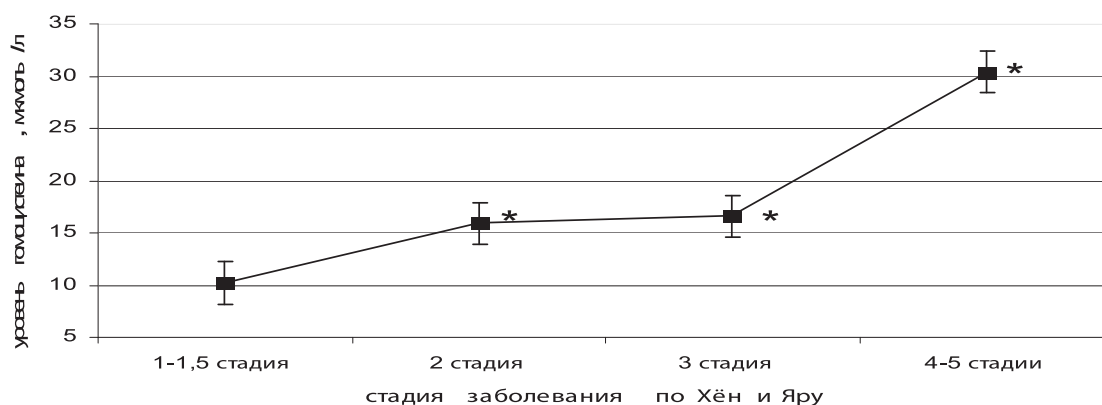


Рисунок 2. Уровень гомоцистеина на разных стадиях БП (* $p<0,001$ по сравнению с ранней стадией болезни).

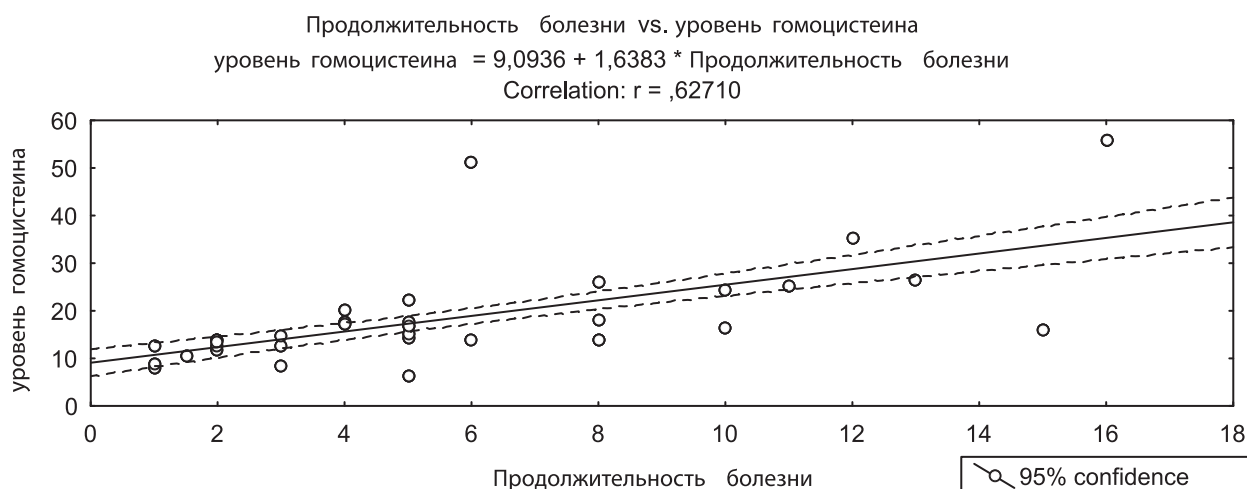


Рисунок 3. Корреляционная связь между продолжительностью заболевания и уровнем гомоцистеина в плазме крови

использование ингибиторов КОМТ (энтакапон, толкапон) уже с момента назначения препаратов леводопы. На поздних стадиях БП дополнительным источником повышенного уровня гомоцистеина становятся глиальные клетки (астроциты), что определяет необходимость использовать ингибитор КОМТ с центральным механизмом действия, хорошо проникающий через гематоэнцефалический барьер, например толкапон [12]. Известно, что уровень гомоцистеина существенно выше у лиц с умеренными когнитивными нарушениями, у которых развилась деменция в течение 3-летнего динамического наблюдения [10]. Таким образом, гомоцистеинемия повышает риск перехода от этапа умеренных когнитивных расстройств к деменции.

Концентрация гомоцистеина в ликворе меняется параллельно с колебаниями в крови, при этом в крови ее концентрация выше в 50–200 раз. Повышенный уровень гомоцистеина рассматривается как фактор, запус-

кающий процесс нейродегенерации и сосудистого повреждения мозга. В исследовании С.В. Wright с соавт. было показано, что повышение уровня гомоцистеина с 8,9 мкмоль/л до 11,9 мкмоль/л сопровождается 3-кратным увеличением количества гиперинтенсивных очагов в белом веществе головного мозга [19]. Возможно, комбинация антагонистов NMDA и метаботропных подтипов глутаматных рецепторов позволит еще более эффективно нейтрализовать патологические эффекты гомоцистеина, и такие исследования уже ведутся [20].

Как уже упоминалось ранее, снижение уровня гомоцистеина при помощи приема витаминов В6, В12 и фолиевой кислоты у пожилых здоровых лиц в двойном слепом рандомизированном 2-летнем исследовании не привело к улучшению когнитивных функций по сравнению с группой плацебо [14]. Вместе с тем, нет ясности, является ли достаточным срок 2 года для оценки положительного эффекта снижения уровня гомоцистеина; в

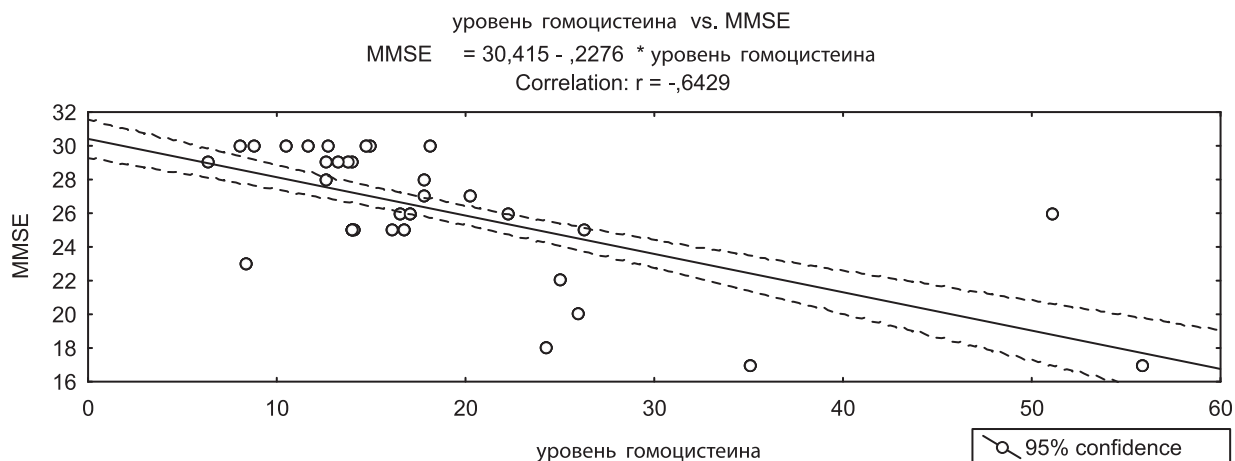


Рисунок 4. Корреляционная связь между уровнем гомоцистеина в плазме крови и показателями нейропсихологического тестирования по шкале MMSE

Таблица 2
Клинико-демографические больных при разном уровне гомоцистеина в плазме крови

Показатели	Гомоцистеин менее 13,5 мкмоль/л (n=30)	Гомоцистеин 13,5-20,0 мкмоль/л (n=48)	Гомоцистеин более 20,0 мкмоль/л (n=24)
Возраст (годы)	63,4±10,7 (47-76)	72,6±3,6 (67-79)	71,8±5,7 (62-79)
Длительность болезни (годы)	3,0±2,6	5,9±3,4	9,4±4,1*
Стадия по Хен/Яру	2,2±0,6	2,6±0,6	3,2±0,9*
Число больных, получающих леводопу	18	48	24
Доза леводопы (мг/сут)	330,0±324,9	562,5±243,6	775,0±247,6
Двигательные нарушения по UPDRS, III часть (баллы)	21,3±4,5	36,8±3,7	58,4±6,3*
MMSE (баллы)	27,6±3,8	27,2±2,0	22,5±3,9*
ФАВ (баллы)	15,3±3,6	14,6±2,2	11,4±3,3*
Тест рисования часов (баллы)	7,9±3,1	7,5±1,8	6,1±2,6*
Число больных с деменцией	6	28*	24*

Примечание: * $p < 0,05$ достоверность различий по сравнению с группой больных с нормальным уровнем гомоцистеина.

этом исследовании не изучалось влияние витаминотерапии на риск развития деменции у наблюдаемых лиц, а исходные показатели когнитивных функций по нейропсихологическим тестам были очень высокими. Возможно, этим объясняется получение отрицательного результата в упомянутой работе. В другом 3-летнем двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании по изучению эффекта длительного приема фолиевой кислоты на когнитивные функции у пожилых людей с умеренными когнитивными нарушениями было показано достоверное улучшение памяти, скорости сенсорных реакций и темпа мыслительных процессов у больных, принимавших фолиевую кислоту [11].

Последние исследования подтверждают положение том, что эффект гипергомоцистеинемии реализуется

спустя годы. И наоборот, для того, чтобы добиться восстановления и стабилизации когнитивных функций вследствие гипергомоцистеинемии, необходим длительный прием больными витаминных препаратов. При отсутствии нормализации уровня гомоцистеинемии целесообразно рассмотреть вопрос о назначении препаратов леводопы вместе с ингибитором КОМТ, а при наличии деменции включение в терапию ингибиторов холинэстеразы (ривастигмин, галантамин) и антагонистов NMDA глутаматных рецепторов (мемантин). Безусловно, требуются дальнейшие исследования, основанные на хорошей доказательной базе, которые могли бы позволить сделать окончательные выводы об эффективных направлениях коррекции гипергомоцистеинемии.

Литература

1. Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М: МЕДпресс-информ, 1999.
2. Зориллова И.В., Суелина З.А., Иллариошкин С.Н., Кистенев Б.А. Мутация Р1173L в гене метионин-синтазы (MTR) как причина гипергомоцистеинемии при ишемическом инсульте молодого возраста. Атмосфера. Нервные болезни 2004; 4: 33-35.
3. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М: Янус-К, 2003.
4. Литвиненко И.В. Болезнь Паркинсона. М: Миклош, 2006.
5. Экстрапирамидные расстройства (ред. В.Н. Шток, И.А. Иванова-Смоленская, О.С.Левин). М: МЕДпресс-информ, 2002.
6. Bachmann C.G., Guth N., Helmschmied K. et al. Homocysteine in restless legs syndrome. Sleep Med. 2007 [Epub ahead of print].
7. Burn D.J. Parkinson's disease dementia: what's in a Lewy body? J. Neural. Transm. 2006; 70 (Suppl.): 361-365.
8. Connelly P.J., Prentice N.P., Cousland G. et al. A randomised double-blind placebo-controlled trial of folic acid supplementation of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. Int. J. Geriatr. Psychiatry 2007; 23: 1262-1263.
9. den Heijer T., Vermeer S.E., Clarke R. et al. Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. Brain 2003; 126: 170-175.
10. Dufouil C., AlpOrovitch A., Ducros V. et al. Homocysteine, white matter hyperintensities, and cognition in healthy elderly people. Ann. Neurol. 2003; 53: 214-235.
11. Durga J., van Boxtel M.P., Schouten E.G. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. Lancet 2007; 369 (9557): 208-224.
12. Huang G., Dragan M., Freeman D. et al. Activation of catechol-O-methyltransferase in astrocytes stimulates homocysteine synthesis and export to neurons. Glia 2005; 51: 47-55.
13. Jellinger K.A. The morphological basis of mental dysfunction in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 2006; 248: 167-172.
14. McMahon J.A., Green T.J., Skeaff C.M. A controlled trial of homocysteine lowering and cognitive performance. N. Engl. J. Med. 2006; 354: 2764-2772.

15. Oishi N., Hashikawa K., Yoshida H. Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson's disease with (123) I-5IA SPECT. *J. Neurol. Sci.* 2007; 256: 52–60
16. O'Suilleabhain P.E., Sung V., Hernandez C. et al. Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch. Neurol.* 2004; 61: 865–868.
17. Rogers J.D., Sanchez-Saffon A., Frol A.B. et al. Elevated plasma homocysteine levels in patients treated with levodopa: association with vascular disease. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 59–64.
18. Sachdev P. Homocysteine, cerebrovascular disease and brain atrophy. *J. Neurol. Sci.* 2004; 226: 25–29.
19. Wright C.B., Paik M.C., Brown T.R. et al. Total homocysteine is associated with white matter hyperintensity volume: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 2005; 36: 1207–1211.
20. Zieminska E., Lazarewicz J.W. Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2006; 66: 301–309.