

УДК 616.895.8—092.9—07:616.831—008.94:577.175.523.—02:616.831—008.931:577.152.143

О ВОЗМОЖНОСТИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ,
ПРИВОДЯЩИХ К НАРУШЕНИЮ МЕТАБОЛИЗМА
КАТЕХОЛАМИНОВ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ,
НА СТАДИИ БИОСИНТЕЗА НОРАДРЕНАЛИНА

БОЯДЖЯН А. С., МАНУКЯН К. Л., АЙВАЗЯН В. А., ПОГОСЯН А. С.,
КАЗАРЯН Н. П., КАРАГЕЗЯН К. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Показано, что через 1 ч после субокипитального введения крысам антител к дофамин-β-монооксигеназе (не менее 1,2 мкг на 1 кг массы животного) происходит понижение уровня норадреналина и повышение уровня дофамина в ткани головного мозга. Наблюдаемый эффект стабилен в течение 6—12 ч. Как показано несколькими независимыми методами, действие антител является специфичным и не обусловлено цитотоксическим воздействием на клетки мозга. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемый при шизофрении дисбаланс между уровнями норадреналина и дофамина в ЦНС может являться результатом понижения активности дофамин-β-монооксигеназы. Обсуждается возможность использования антител к дофамин-β-монооксигеназе для моделирования шизофрении.

Одним из основных факторов, индуцирующих шизофрению и различные формы психозов, является резкое возрастание концентрации дофамина (ДА) в пресинаптических окончаниях мозга, приводящее к стойкой блокаде соответствующих рецепторов, вызванное нарушением в ЦНС баланса между норадреналином (НА) и ДА в пользу второго [1—4]. Биосинтез НА из ДА катализирует фермент дофамин-β-монооксигеназа (ДБМ) (КФ 1.14.17.1), локализованный в мозгу в нейросекреторных гранулах окончаний адренергических нейронов; при стимуляции выделения ДБМ вместе с катехоламинами через лимфу высвобождаются в СМЖ и кровь [5]. За последнее время накопился довольно обширный клинический материал [6—8], свидетельствующий о значительном понижении в крови и СМЖ уровней активности ДБМ при указанной патологии, что рассматривается как одна из возможных причин избыточного образования ДА. Является ли пониженный уровень ДБМ у больных шизофренией генетически обусловленным либо это результат развития наблюдаемых при данной патологии аутоиммунных процессов [9, 10], эти вопросы до настоящего времени не выяснены. К сожалению, прямых экспериментальных доказательств повышения уровня ДА в ЦНС как следствия снижения активности ДБМ пока не представлено.

В настоящем исследовании нам удалось воспроизвести наблюдаемый при шизофрении дисбаланс между НА и ДА посредством блокады ДБМ специфическими к ферменту антителами (АТ).

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс-самцов массой 150—200 г и кроликов породы шиншилла массой 1,5—2 кг. Электрофоретически гомогенные препараты ДБМ из мозгового слоя надпочечников быка получали по методу Ljones и соавт. [11]. Иммунизацию кроликов бычьей ДБМ проводили в два этапа (с интервалом 30 дней) введением в подколенный лимфатический узел раствора фермента в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6,5 (4 мг в 1 мл), из расчета 0,8 мг белка/1 кг массы животного. Электрофоретически гомогенную фракцию АТ к ДБМ (фракция иммуноглобулинов G, 150 кД) получали из кроличьей антисыворотки посредством осаждения белков сульфатом аммония (40%) и ионнообменной хроматографии на ДЭАЭ-ц (ДЕ-32, «Sigma», США) [12]. Специфичность кроличьей антисыворотки и фракций, содержащих АТ к ДБМ, определяли двойной иммунодиффузией на агаре («Difco», США) [13]. Концентрацию белка определяли методом Lowry и соавт. [14], используя БСА в качестве стандарта. Концентрирование препаратов ДБМ и АТ проводили «сухим» диализом, используя полиэтиленгликоль с величиной M_r 35 кД («Fluka» Швейцария). Раствор АТ (2 мг в 1 мл) в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5, вводили крысам субокипитально. Ранее было показано, что АТ к бычьей ДБМ кросс-реактивен по отношению к ферменту, выделенному из мозга крыс [15]. Контрольным животным вводили либо буфер без АТ, либо АТ, инактивированные термообработкой (60°, 20 мин); предварительно было установлено, что обработанные таким образом АТ не способны к взаимодействию с ДБМ. Концентрацию НА и ДА определяли методом флуоресцентного анализа [16], предварительно отмыв мозг от крови физиологическим раствором. Получение меченных пиридоксальфосфатом АТ (ковалентная сшивка по ϵ -аминогруппам остатков лизина) проводили следующим образом: АТ (4 мг в 1 мл) инкубировали с 10-кратным молярным избытком пиридоксальфосфата при pH 8,5 в 10 мМ Na_2HPO_4 в течение 1 ч в темноте, после чего добавляли насыщенный раствор боргидрита натрия и доводили pH инкубационной смеси до 7,5 1 М NaH_2PO_4 . Избыток пиридоксальфосфата удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенном 10 мМ натрий-фосфатным буфером pH 7,5. Подобная обработка приводит к потере около 30% АТ (вследствие денатурации), что находится в пределах допущений данного метода. Концентрацию включившегося в состав АТ пиридоксальфосфата рассчитывали, исходя из значения коэффициента молярной экстинкции полосы при 334 нм, характерной для пиридоксальфосфата ($E_{334\text{нм}} = 9700 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). В результате

вышеописанной обработки на 1 молекулу АТ приходилось 5 молекул пиридоксальфосфата. Исследование наличия у АТ к ДБМ возможного цитотоксического воздействия проводили на культуре клеток нейробластомы (субклон N-2а опухоли C-1300). Клетки культивировали на среде Игла с 10%-ной сывороткой крови зародыша крупного рогатого скота (коровы) в присутствии АТ (0,01 мл (2,6 мг/мл) на 1 мл среды). Перед добавлением в среду АТ стерилизовали под воздействием рентгеновских лучей (100 рентген, 15 мин) на установке «РУМБ-26» отечественного производства. Обработанные подобным образом АТ не теряли способность к взаимодействию с ДБМ. В контрольных экспериментах использовали ту же среду без АТ. Эффективность клонирования ($\Sigma_{кл}$) определяли по критерию образования колоний согласно формуле.

$$\Sigma_{кл} = \frac{\text{число колоний}}{\text{число посеянных клеток}} \times 100\% \quad [17]$$

В качестве красителя использовали кристаллический виолетовый. Динамику размножения клеток или пролиферативную активность исследовали методом посева равного количества клеток во флаконы Карреля с последующим (через каждые 24 ч) подсчетом их в камере Фукса-Розенталя. Представленные ниже результаты являются средними трех независимых экспериментов (три посева), каждый из которых включал от 15 до 20 параллелей.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «Spekord M-40» (Германия), спектрофлуориметрах «Perkin-Elmer MPF-44A» (Швеция) и «Fagand Optical CO» (США) в кюветках с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, представленных в табл. 1, через 1 ч после субокипитального введения крысам АТ к ДБМ (2,6 мкг АТ/1 г массы животного) происходит резкое снижение в мозговой ткани концентрации НА (практически до нуля) и повышение концентрации ДА (приблизительно в три раза) по сравнению с исходными уровнями этих соединений у контрольных животных. Отмеченное воздействие проявляется при введении не менее 1,2 мкг АТ/1 г массы животного. Максимальный эффект наблюдался при введении 3 мкг АТ/1 г массы животного: более высокие количества АТ не приводили к дальнейшему изменению уровней катехоламинов в мозговой ткани (эффект насыщения). Как следует из данных, представленных на рис. 1, воздействие АТ к ДБМ на уровни НА и ДА стабильно в течение 6—12 ч. Эксперименты с использованием меченных пиридоксальфосфатом АТ к ДБМ показали, что АТ, субокипитально введенные крысам, доходят до ткани мозга. В этих экспериментах через 1 ч после введения АТ крыс декапитировали, мозг промывали физиологическим раствором для удаления крови и гомогенизировали

в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,1%-ный тритон X-100 и 1%-ный NaCl (2 мл буфера/100 мг ткани мозга) в гомогенизаторе Поттера. Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин и осадок вновь подвергали вышеописанной процедуре. Суммарный надосадочный раствор анализировали против того же буфера без тритона, а затем против того же буфера без NaCl. Далее раствор концентрировали до 3 мл и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефарозой 6В (1,8×25 см), уравновешенной 10 мМ буфером. В элюируемых с колонки фракциях регистрировали характерное для пиридоксальфосфата оптическое поглощение при 334 нм и интенсивность флуоресценции при 405 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 334$ нм). Полученные данные показали, что через 1 ч после субокципитального введения меченные пиридоксальфосфатом АТ к ДБМ обнаруживались в белковых экстрактах мозга крыс.

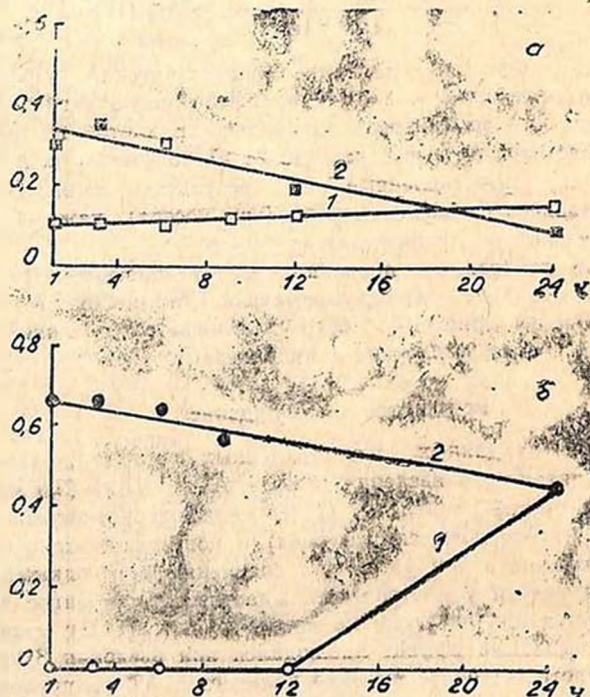


Рис. 1. Зависимость уровней ДА (а) и НА (б) в головном мозгу крыс от времени, прошедшего после введения АТ к ДБМ. 1—контроль. 2—опыт. Каждая точка является средним десяти экспериментов. Концентрация введенных АТ составляет 2,6 мкг на 1 г массы животного. По оси ординат — концентрация норадреналина и дофамина в $\mu\text{г/г}$ ткани мозга.

Ранее в экспериментах *in vitro* при использовании суспензии хро-
маффинных клеток нами было показано, что АТ к ДБМ способны

проникать через плазматическую мембрану и мембрану нейросекреторных гранул, доходя таким образом до места локализации фермента и блокируя последний [18]. Аналогичные данные были получены при использовании синаптосом из коры головного мозга быка и кроличьей антисыворотки [19], а также при использовании цельного мозга крыс и АТ к бычьей ДБМ [20]. Таким образом, на основании полученных нами и другими авторами данных можно с достаточной степенью достоверности утверждать, что при субокципитальном введении АТ к ДБМ проходят через ГЭБ в мозговую ткань и доходят до места локализации фермента.

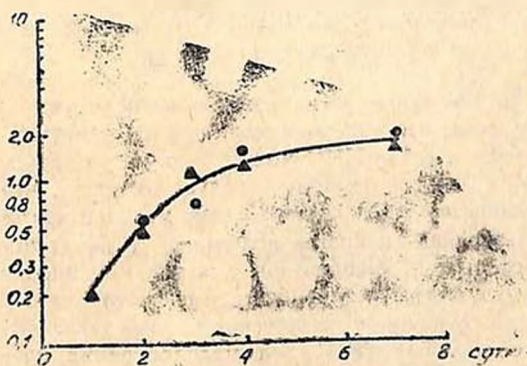


Рис. 2. Динамика размножения клеток нейробластомы в присутствии (▲—▲) и без (●—●) АТ к ДБМ. По оси ординат число клеток $\cdot 10^3$, в логарифмическом масштабе

С другой стороны, нами была исключена возможность неспецифического воздействия АТ на уровни ДА и НА в мозговой ткани, поскольку никаких различий между содержанием этих соединений у контрольных животных в зависимости от того, вводили им буфер без АТ, либо АТ, инактивированные термообработкой, не было выявлено. О специфичности воздействия АТ свидетельствовало также отсутствие линейной зависимости между количеством вводимых АТ и уровнями НА и ДА (эффект насыщения). Кроме того, эксперименты на культуре клеток нейробластомы свидетельствовали об отсутствии у АТ к ДБМ цитотоксической активности, что является еще одним независимым критерием специфичности воздействия АТ. Согласно результатам отмеченных экспериментов $\Sigma_{кл}$ клеток нейробластомы, инкубированных в среде с АТ, практически не отличалась от $\Sigma_{кл}$ контрольных клеток и составляла соответственно 63 и 61%. На рис. 2 показана зависимость роста числа клеток нейробластомы от времени их культивирования в присутствии и без АТ к ДБМ. Как следует из представленных данных, АТ не оказывают существенного влияния на пролиферативную активность клеток.

Таблица

Воздействие АТ к ДБМ на уровни НА и ДА
в головном мозгу крыс

	Концентрация катехоламинов, мкг/г ткани мозга	
	контроль	опыт
НА*	0,35	0,01
ДА**	0,40	1,10

Примечание. *— $p < 0.001$, **— $p < 0.01$.
Концентрация введенных АТ составляет 2.6 мкг
на 1 г массы животного.

Данные, представленные в настоящем исследовании, свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемый при шизофрении дисбаланс между уровнями НА и ДА в ЦНС может быть результатом понижения активности ДБМ. С другой стороны, следует отметить, что в настоящее время большинство экспериментальных моделей шизофрении основано на использовании агонистов дофамина (амфетаминовые психозы и т. п.), которые не воспроизводят, в той или иной степени, ни одну из стадий нарушения метаболизма, имеющего место при данной патологии, а лишь отражают ее конечный результат [21]. В этом аспекте, применение АТ к ДБМ для моделирования шизофрении у животных представляется, на наш взгляд, весьма перспективным.

ABOUT THE POSSIBILITY OF MODELING THE PROCESSES RESULT IN THE DISORDER IN CATECHOLAMINE METABOLISM ON THE STATE OF NORADRENALINE BIOSYNTHESIS UNDER THE SCHIZOPHRENIA

BOYAJYAN A. S., MANUKYAN K. L., AIVAZYAN V. A., POGOSYAN A. S.,
KAZARYAN N. P., KARAGEUZYAN K. G.

Institute of Molecular Biology, Natl. Acad. Sci., of Rep. Armenia, Yerevan

In one hour after the suboccipital injection of antibodies to dopamine- β -monooxygenase into rats (not less than 1,6 μ g/g of body weight) the decrease of noradrenaline and the increase of dopamine have been observed. This effect was stable at a period of 6—12 hours. By the use of several independent procedures it has been shown that the influence of antibodies is specific and not connected with cytotoxic effect. The data obtained suggest that a disbalance between dopamine and noradrenaline observed under schizophrenia may be the result of a decrease in dopamine- β -monooxygenase levels. The possibility is discussed about the use of antibodies to dopamine- β -monooxygenase to modeling the schizophrenia.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hetley L., Berg R., Schlesinger T.* Neurochem. Path., v. 7, p. 221—232, 1987.
2. *Oke A. F., Adams R. N.*, Schizophrenia Bulletin, v. 13, p. 589—604, 1987.
3. *Oke A. F., Adams R. N., Winblad B., VonKnorring L.* Biol. Psychiatry, v. 24, p. 79—82, 1988.
4. *Reynolds G. P.* British Journal of Psychiatry, v. 155, p. 305—316, 1989.
5. *Смит А. Д.* Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патоно), М., Медицина, с. 9—21, 1982.
6. *Baron M., Gruen R., Levitt M., Kane S.* Neuropsychobiology, v. 8, p. 312—314, 1982.
7. *Rato M. A., Bagdy G., Blamal F., Perengi A., Richmer Z.* Pharmacopsychiatría, v. 16, p. 19—23, 1983.
8. *Markianos M., Rinieris P., Hatzimanolis J., Stefanis C.* Biol. Psychiatry, v. 27, p. 1176—1178, 1990.
9. *Крыжановский Г. Н., Мазаева С. В.* Нейроиммунные процессы в механизмах недементализирующей патологии ЦНС. «Итоги науки и техники» (Иммунология), Москва: ВИНТИ, т. 25, с. 121—169, 1990.
10. *Коляскина Т. Н., Секирина Т. П.* Иммунологические исследования при шизофрении: проблемы и перспективы. «Итоги науки и техники» (Иммунология), Москва: ВИНТИ, т. 25, с. 169—198, 1990.
11. *Ljones T., Skotland T., Flatmark T.* Eur. J. Biochem. v. 61, p. 527—533, 1976.
12. *Гаурониз Ф.* Иммунохимия и биосинтез антител, М., Мир, 1969.
13. *Ouchterlony D.* Handbook of Experimental Immunology (ed. D. M. Weir), Oxford, p. 655, 1967.
14. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. *Scotland T., Ljones T.* Inorg. Perspect. Biol. Med., v. 2, p. 151—180, 1979.
16. *Euler U. S., Lishajko F.* Acta physiol. Scand., v. 57, p. 122—132, 1963.
17. *Duncan M., Brooks P.* Mut. Res., v. 21, p. 107—118, 1983.
18. *Boyajian A. S., Karageuzyan K. G., Mousesyan A. V., Alexanyan Y. T.* Abstracts of the 19th World Congress ISP—JOCS, September 26—60, Tokyo, Japan, p. 353, 1988.
19. *Docherty M., Bradford H. F., Joh T. H.* FEBS Lett., v. 262, p. 37—4, 1986.
20. *Liposits Zs., Phexix C., Paull W. K.* Histochemistry, v. 84, p. 105—120, 1986.
21. *Kety S. S.* Fed. Proc., v. 37, p. 2267—2270, 1978.

Поступила 29. IX. 1992