

УДК 612. 822. 1 + 616. 858—008. 6

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПАРКИНСОНИЗМОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕБНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Корешонков О. Н., Корольков А. В., Никитин А. О.

Маргулис М. Н., Дамбинова С. А.

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

В работе исследовали низкомолекулярные пептидные фракции плазмы крови больных паркинсонизмом, для лечения которых применяли аутогеомоливоротрансфузию и лечебные электрические стимуляции и аналогичные фракции, выделенные из плазмы здоровых доноров. Определен диапазон величин M_r , в котором происходят количественные и качественные изменения пептидного состава плазмы крови у больных по сравнению со здоровыми донорами. Проводили изучение ингибирующего действия пептидных фракций на связывание $L[{}^3H]$ глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крыс. Влияние исследуемых фракций на физиологические ответы идентифицированных нейронов пресноводного моллюска *Planorbis corneus* изучали методом внутриклеточной регистрации потенциала. Влияние пептидов на дофаминергические системы мозга исследовали на поведенческих моделях у экспериментальных животных.

* * *

Одним из наиболее перспективных исследований современной нейрофизиологии является поиск, выделение и изучение пептидов, обладающих выраженной способностью направленно модулировать различные функциональные состояния головного мозга человека. Конкретным практическим выходом этих исследований является разработка новых подходов к лечению трудно поддающихся для коррекции заболеваний НС, в том числе паркинсонизма.

В 1984 г. Н. П. Бехтерева [1] выдвинула гипотезу об участии малых нейропептидов — одного из важных классов межсистемных биорегуляторов в механизмах стойкости лечебного эффекта электростимуляции и в процессах преодоления устойчивого патологического состояния. Впоследствии с помощью биохимических методов была подтверждена справедливость высказанного предположения. Так, было обнаружено, что лечебные электростимуляции (ЛЭС), проводимые через интрацеребральные электроды, долгосрочно вживленные в патогенетически обоснованные структуры головного мозга у больных паркинсонизмом, вызывали выброс и накопление низкомолекулярных пептидных фракций в крови и СМЖ [1, 2].

Было показано, что пептидные фракции с величиной M_r менее 5 кД обладали компенсаторным модуляторным действием на преимущественно пораженные медиаторные системы: дофаминергические, холинергические и глутаматергические синапсы [2, 3]. Наиболее важным в этих

исследованиях оказалось то, что лечение больных паркинсонизмом с помощью эндолюмбальной аутотрансфузии указанных пептидов, выделенных из крови больного, вызывало стойкий положительный эффект, сопоставимый по клиническому действию с ЛЭС [4, 5].

В связи с вышесказанным, несомненный интерес представляли дальнейшие углубленные биохимические исследования пептидных фракций крови, составляющих группу так называемых «средних молекул» [6] с целью выявления конкретных молекулярных субстратов, ответственных за лечебный эффект ЛЭС и аутогемоликворотрансфузии (АГЛТ), и создание на их основе нового класса фармакологических средств лечения паркинсонизма. В настоящей работе была предпринята попытка сравнительного анализа пептидных фракций, выделенных из крови больных паркинсонизмом до и после лечебных воздействий: ЛЭС и АГЛТ.

Материалы и методы

В исследованиях использовали кровь и СМЖ 5-и больных паркинсонизмом, которым по медицинским показаниям были вживлены золотые электроды в патогенетически обоснованные структуры головного мозга.* АГЛТ была проведена у 3 больных паркинсонизмом, у которых наблюдали выраженный положительный клинический эффект.

Плазму крови и надосадочную СМЖ получали путем центрифугирования при 4° в течение 20 мин при 5000 г. Для первичного фракционирования плазмы и СМЖ использовали гель-фильтрацию на колонке (80 × 1,6), заполненную сефадексом G-50 («Pharmacia», Швеция). В качестве элюента брали 0,15 М NaCl, который пропускали со скоростью 0,45 мл/мин, фракции отбирали по 4,5 мл, их регистрацию проводили с помощью УФ детектора при длине волны 210 нм. СМЖ фракционировали в аналогичных условиях.

Низкомолекулярные компоненты плазмы крови и СМЖ отделяли с помощью ультрафильтрации на ячейке AMICON (Голландия) с фильтром DIAFLO PM10 (Ирландия).

Дальнейший анализ фракций проводили на высокоэффективном хроматографе («Gilson», Франция), на колонке SI-100 POLYOL 0,03 мкм («Serva», ФРГ). В качестве элюента использовали 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, скорость потока 1 мл/мин, детекцию проводили при 210 нм.

Биологическую активность пептидных фракций крови на глутаматергические медиаторные системы определяли радиолигандным методом [7]. Анализ эффектов пептидов проводили по конкуренции за связывающие участки L [³H] глутамата, который взаимодействовал специфически с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крысы и посмертных препаратов коры головного мозга человека. Ранее описанный метод модифицировали для исследования больших количеств

* Авторы приносят глубокую благодарность зав. нейрохирургическим отделением клини-
ки НИИ экспериментальной медицины АМН СССР к.м.н. Ф.А.Гурчину и нейрохирургу
А.Г.Нарышкину за клиническое обследование и лечение больных паркинсонизмом.

веществ с использованием 96-ячеечного прибора Minifold (ФРГ) на фильтрах GF («Whatman», Англия). Математическую обработку результатов проводили с помощью программ, составленных для компьютера APPLE-IIe (США).

Влияние пептидов на физиологические ответы идентифицированных нейронов пресноводного моллюска *Planorbis corneus* изучали методом внутриклеточной регистрации потенциала при аппликации L-глутамата способом суперфузии [8]. Выделенное кольцо ганглиев из моллюска обрабатывали 30 мин проназой («Sigma», США) для удаления оболочек ганглиев, препарат укрепляли в проточной камере электрофизиологической установки. Пептидные фракции добавляли в камеру, включали проток и апплицировали L-глутамат (10^{-6} — 10^{-4} М). Изменение мембранного потенциала и трансмембранных токов регистрировали с помощью усилителя нейронной активности ЭПМ и самописца Н-327-3 (СССР).

Антипаркинсоническую активность выделенных фракций оценивали по влиянию последних на галоперидоловую катаlepsию у белых мышей [9]. Опыты проводили в одно и то же время суток, при постоянной температуре и интенсивности освещения. Влияние на галоперидоловую катаlepsию определяли путем внутрибрюшинного введения фракций за 15 мин до введения галоперидола (2,5 мг/кг) и оценивали через 10, 30, 60 и 120 мин по числу животных, находящихся в состоянии катаlepsии более 2 мин.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что на фоне положительного клинического эффекта ЛЭС у больных паркинсонизмом наибольшие изменения наблюдаются в белково-пептидном спектре крови и СМЖ в области 5 кД [1, 2]. Поэтому мы попытались обнаружить существенные различия между пептидными фракциями в зоне «средних молекул».

Для сравнительного анализа экспериментальных данных по распределению пиков на хроматограмме (рис. 1) была использована относительная величина V_e/V_0 , где V_e — объем эволюции данного компонента, а V_0 — свободный объем колонки. На рис. 1 показано, что у больных паркинсонизмом по сравнению со здоровыми донорами происходит перераспределение нингидринположительного материала по фракциям: во-первых, появляется новый пик с $V_e/V_0 = 2,5$; во-вторых, увеличивается содержание материала соответствующему пику с $V_e/V_0 = 3,3$, но при этом практически не обнаруживается материала, соответствующего пику с $V_e/V_0 = 2,9$. Видимых различий в составе пика, содержащего вещества с величиной M_r менее 500 Д, не обнаружено.

Дальнейшее исследование проводили методом ВЭЖХ (рис. 2). Используя калибровку, построенную для применяемой колонки, удалось уточнить диапазон величин M_r исследуемых фракций, который оказался равным 2500—300 Д. Этим методом оказалось возможным так же подтвердить наблюдаемые при гель-фильтрации на сефадексе G-50 количественные и качественные изменения в пептидном составе между здоровыми донорами и больными паркинсонизмом, но уже в более ограниченном

диапазоне величин M_r .

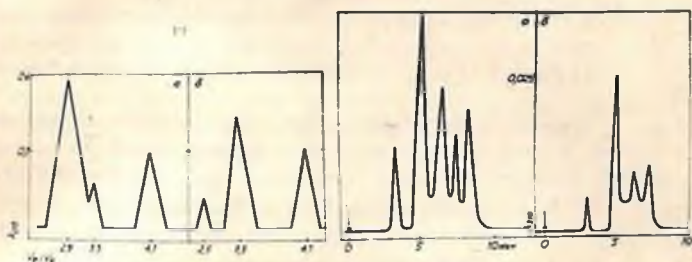


Рис. 1. Схематическое изображение хроматограммы плазмы крови, полученной на колонке $80 \times 1,6$ см с сефадексом G-50: а — плазма крови здорового донора, б — больного паркинсонизмом. Белковые пики с M_r более 6,5 кД не показаны. Здесь и на рис. 3 по оси абсцисс — отношение объема удержания компонента к свободному объему колонки, по оси ординат — показатель поглощения при 210 нм

Рис. 2. Схематическое изображение хроматограммы фракции с M_r 300—2500 Д, выделенной при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-50, полученной на колонке CL-100 POLYOL 0,03 мкм. а — здоровый донор, б — больной паркинсонизмом. По оси абсцисс — время выхода компонентов в мин, по оси ординат — поглощение при 210 нм

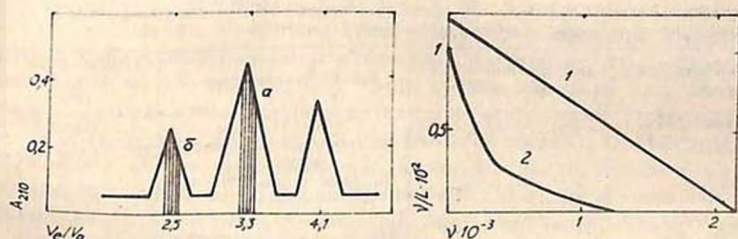


Рис. 3. Схематическое изображение хроматограммы плазмы крови больных паркинсонизмом на колонке $80 \times 1,6$ см с сефадексом G-50. Заштрихованные фракции применяли при аутогемоликторотрансфузии (АГЛТ). а — фракция, обладающая эффектом при АГЛТ, б — фракция, не обладающая эффектом при АГЛТ

Рис. 4. График Скотчарда для связывания [3H] глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крыс. 1 — контроль, 2 — контроль в присутствии пептидных фракций. По оси абсцисс — число молей лиганда, связанного с одним молем макромолекул, по оси ординат — отношение числа молей лиганда, связанного с одним молем макромолекул к концентрации свободного лиганда

Количественное определение пептидов во фракциях проводили с

помощью известного флуорескаминного метода [10]. Как было обнаружено, концентрации пептидов, выделенных из плазмы здоровых доноров в зоне 2500—300 Д в 1,5—2 раза выше, чем у больных паркинсонизмом. В данном случае учитывалось только относительное изменение концентрации, так как точное количественное определение пептидов в биологических жидкостях осложнено низкими концентрациями и большим количеством примесей.

На рис. 3 представлена хроматограмма плазмы больных паркинсонизмом, у которых в качестве лечебного воздействия применяли АГЛТ. Из исследованных фракций лечебным эффектом обладали при АГЛТ только фракции пептидов, относящихся к зоне с величиной M_r 2500—300 Д (фракция *a* на рис. 3), фракция с величиной M_r 2500—5000 Д (фракция *b* на рис. 3) лечебным эффектом не обладала.

Известно, что после эффективных ЛЭС у больных паркинсонизмом наблюдается появление низкомолекулярных пептидных фракций, которые обладают выраженным биологическим действием на холинергические и дофаминергические медиаторные системы. Согласно последним литературным данным [11, структурай мозга, ответственной за реализацию двигательных функций организма, является стриатум. Двигательные расстройства связываются с нарушением взаимодействия между двумя его афферентными входами, которые включают дофаминергические и глутаматчувствительные синапсы. В связи с вышесказанным существенный интерес представляет изучение влияния выделенных нами пептидных фракций на указанные медиаторные системы в разных экспериментальных моделях.

Таблица

Ингибирующее действие пептидных фракций, выделенных из плазмы крови и СМЖ больных паркинсонизмом до и после лечебных воздействий

Биологическая жидкость	Вид лечебного воздействия	Время взятия пробы	% связывания глутамата от контроля (100%)
Плазма крови	АГЛТ	До АГЛТ	10,6 ± 1,2
		На фоне максимального эффекта	18,4 ± 1,6
		На фоне ослабления эффекта	7,6 ± 1,1
		До АГЛТ	13,3 ± 0,4
СМЖ	АГЛТ	На фоне максимального эффекта	27,3 ± 1,3
		На фоне ослабления эффекта	10,2 ± 0,4
		До АГЛТ	7,4 ± 1,6
		На фоне эффекта	16,5 ± 1,5
Плазма крови	ЛЭС	До ЛЭС	7,4 ± 1,6
		На фоне эффекта	16,5 ± 1,5

Проведен сравнительный анализ влияния пептидных фракций, обладающих лечебным эффектом при АГЛТ и ЛЭС, на связывание $[^3H]$ глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры головного мозга крысы или посмертных препаратов коры головного мозга человека (таблица). Из таблицы видно, что фракции, выделенные из крови больных после лечебного воздействия, обладали меньшей ингибирующей активностью

Следует пояснить, что лечебное применение той же фракции от здоровых людей пока невозможно в связи с трудностями, возникающими при гетеротрансфузиях.

в отношении связывания L-[H]глутамата с синаптическими мембранами по сравнению с аналогичными фракциями из крови тех же больных до лечебного воздействия. Наблюдалось изменение активности фракций в процессе лечебного воздействия, которое проявилось в усилении ингибирующей активности по мере ослабления лечебного эффекта.

Результат математической обработки полученных данных представлен графически на рис. 4. Выбор координат Скотчарда обусловлен удобством для анализа экспериментальных данных. Для L-глутамата график Скотчарда выглядит в виде прямой линии, что находится в соответствии с ранее описанными данными [7]; подобная зависимость для исследуемых фракций имеет вогнутый вид. Этот факт можно объяснить, если предположить, что под влиянием пептидных фракций происходит модификация глутаматных рецепторов, которая может быть связана с возникновением нескольких типов независимых участков или с взаимодействием идентичных центров одного типа, проявляющегося в отрицательной кооперативности.

Следовательно, можно предположить, что изучаемые фракции обладают модуляторным действием на глутаматчувствительные медиаторные системы нервных клеток.

Действительно, изучение физиологических ответов нейрона моллюска при аппликации пептидных фракций показало, что они обладают модулирующим и возбуждающим действием (рис. 5). Обычно аппликация глутамата к поверхности мембраны идентифицированных нейронов приводила к двухфазному ответу: короткая по времени деполяризация сменялась более длительной гиперполяризацией, в то время как аппликация АХ вызывала только деполяризацию мембраны [12]. Пептидные фракции, выделенные из ликвора или крови, вызывали длительную, до одной минуты, деполяризацию мембраны, и увеличение частоты разрядов нейронов со спонтанной активностью. Фракции, взятые из проб биологических жидкостей до лечебного воздействия, проявляли более сильный эффект, чем исследуемые фракции после воздействия. АХЭ, добавленная к тестируемым фракциям в достаточном количестве для инактивации АХ в высших физиологических концентрациях, уменьшала величину деполяризации мембраны при аппликации проб. Глутамат апплицировали сразу после ответа нейрона на пробы, что вызывало возобновление длительной деполяризации мембраны. В некоторых случаях ответ нейрона был избирательно однофазным. Очевидно, это объясняется различиями в концентрациях пептидов и соответственно различными уровнями десенситизации D- и H-рецепторов глутамата. В то же время ответы на АХ были без изменений. Кроме того, тестируемые вещества изменяли спонтанную ритмическую активность на пачечную. Все перечисленные модулирующие действия — изменение ответов на медиаторы и характер спонтанной активности, которые снимались после 10—15-минутной отмывки, а также зависимость ответов от наличия протеолитических ферментов — свидетельствуют в пользу гипотезы о пептидной природе исследуемых фракций.

Влияние пептидов на дофаминергические системы мозга исследовали на поведенческих моделях у экспериментальных животных. Для изучения антипаркинсонических свойств новых фармакологических препаратов преи-

мушественно используют модели паркинсонизма на мелких животных: фармакологические модели с использованием резерпина, вызывающего выраженное снижение содержания биогенных аминов в мозгу животного, с применением ингибиторов синтеза катехоламинов, например, α -метилтирозина, а также более специфического антагониста дофаминовых рецепторов — галоперидола [13]. Применяют также холинергические препараты, такие как никотин, оксотреморин и т. д., вызывающие у животных тремор центрального генеза, который снимается антипаркинсониками [14].

Вторым вариантом моделирования паркинсонизма является стереотаксическое разрушение головного мозга у обезьян. Третьей группой методов является применение химического разрушения нигро-стриатного дофаминергического тракта специальными нейротоксинами: 6-оксидофамином, а позднее MPTP [15, 16].

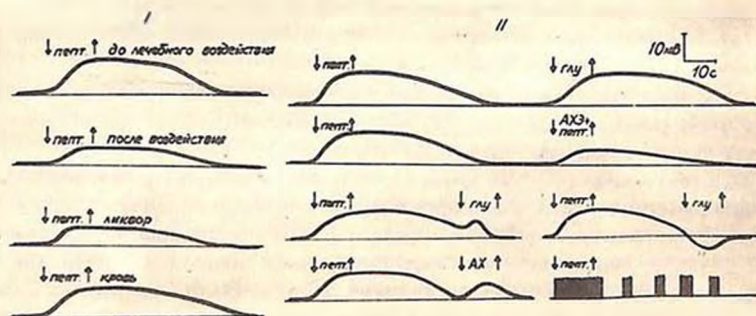


Рис. 5. Возбуждающее (I) и модулирующее (II) действие пептидных фракций, выделенных из плазмы крови и СМЖ, на нейроны моллюска

Для исследования антипаркинсонических свойств фракций плазмы крови больных использовали метод торможения каталептических реакций, вызванных системным введением галоперидола, и определение антирезерпинового эффекта этих фракций при оценке птоза у животных (резерпин 5 мг/кг внутривенно за 24 ч до эксперимента).

Галоперидол, введенный внутривенно в дозе 5 мг/кг в контрольной группе животных, вызывал отчетливое повышение процента животных, находящихся в состоянии катаlepsии в течение всего эксперимента (рис. 6). Фракция пептидов, выделенных из крови больного до АГЛТ, практически не обладала антикаталептической активностью после введения галоперидола. Фракция пептидов, выделенных из крови через 10 ч после АГЛТ, которая сопровождалась выраженным клиническим эффектом, вызвала отчетливый антикаталептический эффект, по своему действию напоминающий эффекты тиреолиберина или меланостатина, способных активировать дофаминергические системы мозга [17].

Антирезерпиновую активность пептидных фракций оценивали визуально по выраженности птоза у белых мышей и выражали по стандартной балльной системе [9]. Максимальному количеству баллов — 4, которое вызывалось резерпином, соответствовало полное смыкание век животного.

Внутрибрюшинное введение пептидных фракций плазмы крови, полученных у больных после эффективных ЛЭС или АГЛТ, вызывало снижение выраженности птоза на 25—30%. Этот эффект сохранялся в течение 1,5—2 ч.

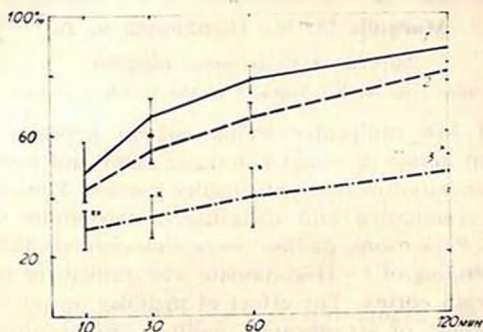


Рис. 6. Антикаталетическая активность пептидных фракций, выделенных из плазмы крови больных паркинсонизмом, у белых мышей после введения галоперидола. 1 — контроль (галоперидол 5 мг/кг внутрибрюшинно), 2 — фракция плазмы крови до проведения аутогемотрансфузии (АГЛТ) или лечебной электрической стимуляции (ЛЭС), 3 — фракция после проведения АГЛТ или ЛЭС, $p < 0,001$, $**p < 0,05$. По оси абсцисс — время в мин, по оси ординат — количество мышей в состоянии катаlepsии (в процентах ко всей группе животных).

Проведенные предварительные эксперименты на моделях паркинсонизма у животных свидетельствуют о влиянии пептидных фракций крови, выделенных у больных после эффективных ЛЭС или АГЛТ, на дофаминергические процессы, угнетенные резерпином и галоперидолом.

Таким образом, полученные результаты подтверждают гипотезу Н. П. Бехтеревой об участии малых пептидов в механизмах стойкости лечебного эффекта электростимуляции. Кроме того, данные об изменениях, происходящих в пептидных фракциях при ЛЭС и АГЛТ позволяют предположить о возможном сходстве механизмов, лежащих в основе этих лечебных воздействий. Дальнейшие эксперименты, направленные на очистку индивидуальных нейропептидов, ответственных за лечебные эффекты, позволяют установить конкретные механизмы, лежащие в основе процессов восстановления мозговых функций, обеспечивающих регуляцию движения.

COMPARATIVE STUDIES OF PATIENTS WITH PARKINSONS DISEASE BEFORE AND AFTER MEDICAL TREATMENT

Koreshonkov O. N., Korol'kov A. V., Nikitin A. O.,
Margulis M. N., Dambinova S. A.

*Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad*

Properties of low molecular weight serum peptides of Parkinsonian patients subjected to liquor or blood autotransfusion and therapeutic electrical stimulation were compared to those of healthy donors. The range of molecular weights exhibiting qualitative and quantitative variations of serum peptide content caused by Parkinsons disease were determined. Inhibitory action of peptides upon the binding of L-³H-glutamate was studied for synaptic membranes isolated from rat brain cortex. The effect of peptides on physiological response of identified neurons of freshwater mollusc *Planorbarius cornaus* was investigated using intracellular potential monitoring technique. Behavioral patterns were studied in order to assess the effects of peptides upon brain dopaminergic systems.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бехтерева Н.П., Дамбинова С.А., Гурчин Ф.А., Смирнов В.М., Корольков А.В., Писоваров А.М. Физиол. журн. СССР, т.70, N8, с.1092—1099, 1984.
2. Бехтерева Н.П., Дамбинова С.А., Корольков А.В. -В сб.: Научно-методические аспекты биологических исследований новых лекарственных препаратов, с.73—85, Рига, Зинатне, 1987.
3. Маргулис М.Н., Корольков А.В., Павлова О.И., Дамбинова С.А. -В сб.: Материалы I Всесоюзной конференции «Принципы и механизмы деятельности мозга человека», с.130—131, Л., Наука, 1985.
4. Бехтерева Н.П., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А. -В Сб.: Тезисы 10-ой Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, с.71—72, Горький, 1987.
5. Бехтерева Н.П., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Корольков А.В., Корешонков О.Н., Нарышкин А.Г. Физиология человека, т.13, N3, с.500—502, 1987.
6. Галактионов С.Г., Николайчик В.В., Цейтин В.М., Михеева Л.М. Химико-фармацевтический журнал, т.11, с.1286—1293, 1983.
7. Дамбинова С.А., Городинский А.И. Биохимия, т.49, N1, с.67—74, 1984.
8. Гапон С.А. Автореферат канд. дисс. «Действие медиаторных веществ на идентифицированные нейроны брюхоногого моллюска роговой катушки», Ленинград, 1981.
9. Вальдман А.В., Козловская М.М., Клуша В.Е., Свиркис Ш.В. Бюл. эксперим. биол. и мед., N6, с.693—696, 1980.
10. Undenfriend S., Stein S., Bohlen P., Dairman W. Science, v.178, p.871—872, 1972.
11. Годухин О.В. Модуляция синаптической передачи в мозге, М., Наука, 1987.
12. Гапон С.А., Качман А.Н., Фролова Е.В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т.XIV, N3, с.259—265, 1978.
13. Zigmond M.J., Stricker E.M. Life Sci., v.35, N1, p.5—18, 1984.
14. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биохимически активных веществ, М., Медицина, 1974.
15. Silbergeld E.K., Calne B. Pharmac. Ther., v.12, p.159—166, 1981.
16. Ricaurte G.A., Irwin I., Forno L.S., Delanney L.E., Langston E., Langston J.W. Brain Res., v.403,

G.Hertting, H.-Ch.Spatz Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity in Nervous System (*NATO ASI Series, v.1119*). Springer, Berlin, 457 p., 1988.

Модуляция синаптической передачи и пластичность нервной системы.

Одной из интереснейших проблем века, неразрешенных и поныне, является выяснение путей передачи и хранения информации в нервной системе и особенно в мозгу человека. В предлагаемой книге пластичность поведения связывается с модуляцией свойств синапсов, осуществляющих связи между нервными клетками в контексте функционирования нервных цепей. Показано, что процессы обучения стали в настоящее время объектом изучения молекулярной биологии. Приводятся аргументы в пользу применения в качестве моделей нервной системы морских моллюсков *Aplysia* и *Hermesena*, плодовых мушек дрозофил и ткани гиппокампа млекопитающих.