

Галармин подавляет синтез амилоидпредшествующего белка на экспериментальной алюминиевой модели болезни Альцгеймера

А.Г. Ваградян

НИЦ, кафедра биохимии ЕрГМУ
375025 Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: гиппокамп, мозг, цитокины, пролактин, пролин-богатый пептид – галармин

Болезнь Альцгеймера (БА) относится к нейродегенеративным расстройствам, в возникновении которой задействованы различные этиопатогенетические механизмы [1]. Одним из важных патогенетических факторов этого заболевания является нарушение механизма образования иммуноцитоклинов. Следует отметить, что именно конкретные иммуноцитоклины, вырабатываемые *in situ* в мозговой ткани, рассматриваются в качестве индуцирующих факторов целого каскада иммунопатологических и нейроэндокринных нарушений [2], приводящих в конечном итоге к появлению в нейрональных клетках атипичных белков – амилоидоподобных масс [3]. В указанном аспекте особая роль отводится интерлейкину-1 (ИЛ-1), ИЛ-6 и фактору некроза опухолей (ФНО). Реализация эффекта ИЛ-1 осуществляется путем конкретного контакта указанного цитокина с нейронными клетками, возможно, и по рецепторному механизму, в то время как ИЛ-6 и ФНО- α стимулируют выработку амилоидоподобных масс опосредованно, путем ингибиции синтеза инсулиноподобного фактора роста (ИФР). Исходя из вышеизложенного, нам представляется весьма целесообразным изучение патогенетических аспектов именно с позиций возникающих при данном страдании иммунопатологических нейроэндокринных расстройств.

Материал и методы

Экспериментальную модель БА создавали на мышах путем однократного подкожного введения 0,2 мл 3% $AlCl_3$. В эксперименте использовали 80 белых мышей самцов массой 30–40 г. Животных подразделяли на следующие три группы: контрольная группа интактных животных, I опытная группа – с однократным введением $AlCl_3$, II опытная группа – на 4-е сутки после введения $AlCl_3$ внутрибрюшинно вводили галармин в дозе 15 и 1,5 мкг/40 г массы животного. Забой животных производили на 8-е сутки после введения

$AlCl_3$. Сыворотку крови и супернатанты, приготовленные из внутренних органов мышей (цельная мозговая ткань, гиппокамп, тимус и печень), подвергали иммуноферментному анализу (ELISA) с целью определения ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 и пролактина. Цитокины определяли при помощи Кит-наборов DRG International Inc (USA), а пролактин – с использованием Кит-набора MicrowellTM FSH EIA (USA). Содержание цитокинов выражали в пкг/мл, а пролактина – в нг/мл.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенного иммуноферментного анализа, после введения $AlCl_3$ [4,5] в сыворотке крови мышей I опытной группы определялись следовые количества ИЛ-1, в то время как у животных контрольной группы ИЛ-1 выявить не удалось (таблица). После однократного введения галармина [6] уровень ИЛ-1 в крови у мышей с алюминиевым нейротоксикозом (II опытная группа) заметно повышался (более чем в 2 раза). В тимусе мышей I опытной группы определялись лишь следовые количества ИЛ-1, в то время как введение галармина (II группа) сопровождалось тенденцией, направленной в сторону нормализации содержания ИЛ-1, однако, показатели ИЛ-1 у этих животных в 1,3 раза были ниже аналогичных показателей животных контрольной группы. В печени животных с алюминиевым токсикозом (I гр.) содержание ИЛ-1 понижалось, в то время как введение галармина приводило к заметному повышению его уровня. В гомогенатах мозга контрольных мышей ИЛ-1 выявить не удалось. При введении $AlCl_3$ определено значительное количество ИЛ-1 в супернатанте мозга. Введение галармина почти в два раза понижало уровень ИЛ-1 в мозговой ткани по сравнению с I опытной группой. В гиппокампе животных контрольной и опытных групп ИЛ-1 определить не удалось.

Таблица

Содержание иммуноцитоккинов и пролактина в сыворотке крови и внутренних органах мышей при алюминиевом нейротоксикозе на фоне введения пролин- богатого пептида – галармина

Объект исследования	Иммуноцитоккины, (нг/мл)	Контроль	AlCl ₃	AlCl ₃ + галармин (15 мкг)	AlCl ₃ + галармин (1,5 мкг)
Сыворотка крови	ИЛ-1	2.4±0.7	59.6±4.8	129.5±7.47	62.8±6.3
	ИЛ-2	232.0±17.6	109.6±17.8 (p<0.01)	286.4±105 (p<0.05)	430.0±20.9 (p<0.05)
	ИЛ-6	1661.0±109.9	326.9±134.0 (p<0.01)	302.1±17.6 (p<0.01)	589.9±27.1 (p<0.01)
	пролактин (нг/мл)	5.3±1.2	1.4±0.7 (p<0.01)	1.9±0.7 (p<0.01)	6.9±1.2 (p<0.01)
Тимус	ИЛ-1	131.2±14.1	следы	97.8±7.6 (p<0.01)	160.4±8.9 (p<0.01)
	ИЛ-2	6543.0±182.3	359.3±14.9 (p<0.01)	1120.6±115.2 (p<0.01)	7200.0±234.6 (p<0.01)
	ИЛ-6	1013.0±51.0	422.3±16.8 (p<0.01)	488.1±13.6 (p<0.01)	302.9±19.5 (p<0.01)
	пролактин (нг/мл)	0.1±0.03	следы	следы	2.6±0.8
Печень	ИЛ-1	146.0±14.9	84.9±7.0 (p<0.01)	197.3±11.4 (p<0.01)	126.4±14.3 (p<0.01)
	ИЛ-2	399.0±21.05	120.6±13.5 (p<0.01)	105.4±12.7 (p<0.01)	248.7±14.5 (p<0.01)
	ИЛ-6	415.9±33.0	103.6±11.5 (p<0.01)	96.1±18.2 (p<0.01)	366.7±22.8 (p<0.01)
	пролактин (нг/мл)	2.5±0.5	—	—	—
Мозг	ИЛ-1	—	176.4±14.1	88.3±13.6	130,3
	ИЛ-2	1590.0±105.0	624.0±25.3 (p<0.01)	1090.0±145.7 (p<0.05)	2433.6±124.3 (p<0.05)
	ИЛ-6	526.7±23.6	1230.0±126.9 (p<0.01)	928.1±25.5 (p<0.01)	634.3±38.0 (p<0.01)
	пролактин (нг/мл)	19.6±3.8	2.9±0.9 (p<0.01)	48.3±7.5	23.7±7.0
Гиппокамп	ИЛ-1	—	—	—	—
	ИЛ-2	—	—	—	—
	ИЛ-6	203.4±18.3	435.1±29.4 (p<0.01)	309.6±31.3 (p<0.05)	284.5±13.3 (p<0.05)
	пролактин (нг/мл)	—	—	—	—

Содержание ИЛ-2 в сыворотке крови, печени и мозге в I опытной группе резко снижалось (более чем в два раза). Введение гипоталамического нейропептида сопровождалось нормализацией различной степени ИЛ-2. В тимусе мышей I опытной группы на фоне высокого уровня ИЛ-2 имело место резкое понижение его содержания (более чем в 18 раз). Введение животным галармина сопровождалось повышением уровня ИЛ-2 в тимусе (более чем в три раза по сравнению с I опытной группой), однако его содержание не нормализовалось (ниже контрольных показателей в шесть раз).

Определенный интерес представляют результаты анализа ИЛ-6. В сыворотке, тимусе и печени животных обеих опытных групп имело место резкое понижение его содержания, однако в гиппокампе и мозге констатируется сравнительно высокий уровень ИЛ-6, который существенно превышал контрольный уровень более чем в 2 и 1,5 раза соответственно.

Следует отметить, что адекватные эффекты эндогенно активных биологических соединений обусловлены их низкой концентрацией в крови, жидких средах организма, поскольку именно такие дозы являются максимально приближенными к концентрациям биологически активных веществ, нейрогормонов и медиаторов вырабатываемых в условиях физиологического функционирования организма. Данное обстоятельство в первую очередь касается биологически активных веществ, нейрогормонов и медиаторов, вырабатываемых в нейроэндокринных структурах головного мозга, поскольку их "секреторная деятельность" реализуется *in situ* по механизму короткодистантных межклеточных взаимоотношений. С другой стороны, нейроэндокринологи, физиологи, патологи, занимающиеся разработкой проблем нейроэндокринной регуляции интегративных систем организма, испытывают известные трудности при выборе конкретных доз вводимых биологически активных факторов. Данное обстоятельство обусловлено и объективными факторами, поскольку эффект изучаемых эндогенно активных соединений реализуется на уровне конкретных систем, органов и тканей, с одной стороны, благодаря эволюционно установленным рецепторным механизмам, с другой, — полученный эффект может быть результатом лишь его "фармакологической активности" и не отражать те закономерности, которые обусловлены механизмами нейроэндокринной регуляции. Именно поэтому нами была апробирована низкая доза галармина, которая в десять раз уступала исходной. Следует особо отметить, что выбор концентрации этого препарата нами был осуществлен соответственно данным литературы на основании его протекторного эффекта. В то же время известно, что медиаторное звено иммунитета является весьма сложной полифункциональной системой, в которой каждая клетка структурно и функционально детерминирована, чем и

обуславливается дозозависимый эффект выработки ими конкретных иммуномодуляторов — цитокинов. Именно поэтому о биологической активности апробированного нами препарата на медиаторное звено иммунной системы мы сочли целесообразным судить на основании иммуноферментного анализа конкретных представителей класса цитокинов при оптимальных и весьма низких концентрациях препарата.

Как показали результаты иммуноферментного анализа, галармин в обеих дозах оказывал аналогичный эффект на уровень ИЛ-1 в тимусе и печени. При введении малых доз галармина в сыворотке крови определялись показатели ИЛ-1, аналогичные таковым I опытной группы. Следует отметить, что введение именно низкой дозы галармина сопровождалось нормализацией уровня ИЛ-2 в тимусе. Не исключено, что подобные концентрации препарата являются наиболее эффективными, поскольку обеспечивают даже в условиях аллюминиевой интоксикации оптимальный уровень ИЛ-2 в центральном органе иммуногенеза. В пользу данного обстоятельства свидетельствует и тот факт, что при введении относительно высоких доз галармина наблюдалась лишь тенденция, направленная в сторону восстановления его уровня, несмотря на то, что и в данном конкретном случае был также зарегистрирован определенный нейропротекторный эффект. Введение высоких концентраций галармина, как было отмечено ранее, не сопровождалось сдвигами в содержании ИЛ-2 в печени, то есть уровень ИЛ-2 во II группе не отличался от первой, в то время как введение низкой дозы галармина повышало уровень ИЛ-2 в печени по сравнению с I опытной группой в два раза. В данном конкретном случае четко прослеживалась тенденция, направленная в сторону нормализации указанного показателя по сравнению с контрольной группой. Следует особо указать, что если введение высокой дозы галармина сопровождалось нормализацией содержания ИЛ-2 в сыворотке крови, то низкие концентрации приводили к заметному его повышению (примерно в два раза по сравнению с контрольной группой).

При исследовании содержания ИЛ-6 в тимусе опытных групп существенных изменений не обнаружено. В обеих группах определялся примерно одинаковый низкий уровень ИЛ-6. Определенный интерес, на наш взгляд, представляют результаты иммуноферментного анализа ИЛ-6 в печени. Так, если введение галармина в высоких дозах практически не влияло на уровень ИЛ-6 печени мышей I опытной группы (определялись одинаковые показатели, более чем в четыре раза меньше, чем контрольный уровень), то введение галармина в дозе, в десять раз уступающей предыдущей, сопровождалось нормализацией уровня ИЛ-6 по сравнению с контрольной группой. При этом уровень ИЛ-6 превышал уровень первой и второй групп более чем в три раза. При введении низкой дозы

более четко прослеживалась тенденция, направленная в сторону нормализации ИЛ-6 в сыворотке крови. Следует отметить, что в целом в сыворотке крови и печени прослеживаются однонаправленные сдвиги содержания ИЛ-6, при которых четко проявляется дозозависимый эффект. Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что низкие концентрации галармина обладают более выраженным стимулирующим эффектом в плане местного синтеза в тимусе ИЛ-1 и ИЛ-2. Следует особо отметить, что именно только низкие концентрации галармина оказывали модулирующее действие на процессы синтеза ИЛ-2 и ИЛ-6 в печени. Аналогичная корреляционная зависимость прослеживалась также при определении уровня ИЛ-2 и ИЛ-6 в сыворотке крови.

На основании проведенных исследований можно сделать заключение, согласно которому различные концентрации одного и того же апробированного нами нейропептида, оказывает разнонаправленный эффект в плане стимулирования и ингибирования конкретных иммуномодуляторов в тимусе и печени. В то же время, как было отмечено выше, низкие дозы оказывали более выраженный стимулирующий медиаторный эффект.

Таким образом, используемый экзогенно вводимый цитокин-галармин на экспериментальной модели БА, несомненно, обладает иммуномодуляторным действием путем избирательной стимуляции или торможения конкретных цитокинов. В указанном аспекте заслуживает внимания то обстоятельство, что введение галармина сопровождалось заметным повышением уровня ИЛ-1 в печени. Учитывая то обстоятельство, что в тимусе и мозге животных II опытной группы уровень ИЛ-1 оставался низким, можно предположить, что высокий уровень ИЛ-1 в сыворотке крови II опытной группы обусловлен избирательным стимулирующим действием галармина на клетки моноцитарно-фагоцитарного ряда печени и, в первую очередь, купферовские клетки. Поскольку ИЛ-1, вырабатываемый в мозговой ткани, выступает в качестве провоцирующего фактора при БА (стимулирует синтез предшественника амилоидного белка в первичных нейронах), можно допустить, что галармин на уровне нейрональных структур частично ингибирует процессы синтеза атипичных нейрональных белков. В пользу данного обстоятельства свидетельствует тот факт, что уровень ИЛ-1 в мозговой ткани в условиях введения галармина снижался в два раза. Результаты определения ИЛ-2 также свидетельствуют в пользу его высокой биологической активности, поскольку, как было показано нами, во всех изучаемых органах четко прослеживалась тенденция нормализации его содержания. Не исключено, что иммуномодулирующее действие галармина опосредовано также стимуляцией синтеза ИЛ-2 в лимфоидных клетках тимуса. Аналогичное допущение приемлемо также и в отношении кле-

ток нейронального генеза, поскольку подобная тенденция наблюдалась и в мозговой ткани.

Особый интерес, на наш взгляд, представляют результаты определения ИЛ-6. Введение $AlCl_3$ сопровождалось резким понижением его содержания как в сыворотке крови, так и в тимусе и печени. Однако галармин в дозе 15 мкг/40г, по-видимому, не обладал модулирующим действием на ИЛ-6 во всех изучаемых тканях. Введение же низких доз галармина сопровождалось заметным повышением уровня ИЛ-6 в печени по сравнению с I опытной группой более чем в три раза. Именно поэтому в данном конкретном случае можно предположить, что в качестве источника синтеза ИЛ-6 могут выступать клетки моноцитарно-фагоцитарного ряда и в первую очередь купферовские клетки печени, о чем свидетельствует отсутствие модуляторного эффекта препарата в плане направленного синтеза того же ИЛ-6 в тимусе в условиях экспериментальной модели БА. Однако особо следует отметить, что в мозге и особенно в гиппокампе модельных животных уровень ИЛ-6 повышался более чем в два раза. Учитывая то обстоятельство, что гиперпродукция вырабатываемых *in situ* иммуоцитоклинов 1 и 6 обуславливает синтез атипичных амилоидных белков нейрональных клеток при БА (ИЛ-1 обладает прямым стимулирующим эффектом, а эффект ИЛ-6 реализуется опосредованно, путем ингибирования синтеза ИФР-1), с определенной уверенностью можно заключить, что используемая нами модель в целом воспроизводит наиболее существенные иммунопатогенетические звенья развития и течения БА у человека. Особо следует отметить, что введение галармина заметно понижало уровень указанных цитокинов (ИЛ-1 и 6) в мозговой ткани по сравнению с опытной группой, что в известной степени свидетельствует о важной модулирующей роли указанного нейропептида в процессах нейроэндокринной регуляции ЦНС и его иммуномодуляторной роли в условиях патологии, в том числе в аспекте торможения каскада региональных иммунопатологических реакций, обуславливающих в конечном итоге синтез аномальных пептидов при нейродегенеративных болезнях типа БА, Паркинсона и т.д.

Не исключено, что направленный иммуномодуляторный эффект галармина реализуется также нейроэндокринными механизмами. В указанном плане особое место, на наш взгляд, должно быть уделено гипоталамическому пролактину, который как в ЦНС, так и в органах иммуногенеза обладает иммуномодуляторным действием, обуславливая направленный синтез широкого спектра цитокинов.

Полученные результаты свидетельствуют, что иммуномодуляторный эффект пролактина на периферии отсутствует. Во всех изучаемых группах выявлена зависимость между низким уровнем пролактина в сыворотке крови, тимусе и печени. Особо следует подчеркнуть то обстоятельство, что в мозге у мышей с

моделью БА содержание пролактина также понижалось (более чем в 6 раз), однако введение галармина приводило к резкому повышению его содержания (в 2,7 раза превышал контрольный уровень). Таким образом, можно предположить, что галармин обладает модулирующим действием на нейроэндокринные структуры гипоталамуса, прямо и/или косвенно стимулируя направленный синтез пролактина.

В заключение следует отметить, что полученные нами результаты не являются исчерпывающими в пла-

не интерпретации выявленных иммунопатологических сдвигов, поэтому в последующем представляется необходимым провести дополнительные исследования в центральных структурах конкретных нейромодуляторов, заинтересованных в патогенезе БА. Речь в первую очередь идет о мелатонине и ИФР-1, поскольку при БА процессы промежуточного и окончательного синтеза амилоидных белков связываются в первую очередь с низким уровнем указанных нейромодуляторов.

Поступила 02.03.02

Գալարմինը ճնշում է ամիլոիդ նախորդող սպիտակուցի սինթեզը Ալցհեյմերի հիվանդության փորձարարական ալյումինային մոդելի պայմաններում

Ն. Գ. Վահրադյան

Կատարվել է Ալցհեյմերի հիվանդության իմունոախտաբանական և նյարդաէնդոկրինային ասպեկտների փորձարարական մոդելային ուսումնասիրություն: Ցույց է տրված, որ ուղեղի էնդոկրինային իմունային համակարգը կարևոր դեր է խաղում իմունային և նյարդաէնդոկրինային խաթարումների պաթոգենեզում: Ենթադրվում է, որ ներորոպայնային ներարկված գալարմինը՝ պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդը, որն արտադրվում է հիպոթալամուսի նյարդասեկրետոր բջիջների կողմից պաշտպանական դեր է կատարում ներորոպային պաթոգենեզում՝ կարգավորելով հիպոֆիզի նյարդաէնդոկրին կառույցները՝ ուղղակի կամ միջնորդավորված խթանելով ցիտոկինների (IL-1, IL-2 և IL-6) և պրոլակտինի

սինթեզը: Ստացված տվյալները վկայում են վերը նշված ցիտոկին-ցիտոկինային հստակ փոխազդեցության մասին: Հարկ է մասնավորապես նշել, որ հիպոթալամուսի նյարդասեկրետոր ցիտոկինը կապված է ցիտոկինների էքսպրեսիայի հետ ինչպես ուսումնասիրված օրգաններում, այնպես էլ հիպոֆիզում: Ըստ Գալոյանի վարկածի՝ գոյություն ունեն ներկորիզային, կամ մոյնիսկ ներբջջային (միկրոյին նյարդասեկրետոր բջիջներում) ներքին փոխազդեցություններ ցիտոկինների և նյարդատրանսմիտերների միջև, որոնք պայմանավորում են ինտերլեյկինների էքսպրեսիան. կարևոր դեր խաղալով նյարդաէնդոկրինային համակարգի կարգավորման մեջ:

Galarmin inhibits the synthesis of amyloid precursor protein in the experimental aluminous model of Alzheimer's disease

H. G. Vahradyan

On the experimental animal model the immunopathological and neuroendocrine aspects of Alzheimer's disease have been studied. It is shown that brain endocrine immune system plays an essential role in the pathogenesis of immune and neurodegenerative disorders. Intraperitoneal administration of galarmin – a prolin rich polypeptide (PRP), isolated from neurosecretory cells of hypothalamus (N. Supraopticus and Paraventricularis) has a protective role in neuronal survival via modulation of neuroendocrine structures of hypophysis, directly and/or indirectly stimulating the synthesis of cytokines (IL-1, IL-2, IL-6) and prolactine.

The obtained data provide evidence for the abovementioned fine cytokine-cytokine interaction. It should be especially emphasized that the neurosecretory cytokine from hypothalamus is related with cytokine expression both in the organs studied and in hypophysis. According to Galoyan's point of view, there are intranuclear (NPV and NSO) or even intracellular (in the same neurosecretory cells) intimate interrelations between the cytokines and neurotransmitters, which contribute to expression of the interleukines, playing an important role in neuroendocrine regulation.

Литература

1. Агаджанов М.И., Ваграбян А.Г., Симонян М.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 2000, 17, 4, с. 294.
2. Зильфян А.В., Согбатьян Л.Т. Мед.наука Армении, НАН РА 2000, XL, 3, с. 23.
3. Hull M., Fiebich B.L., et al. Neurochemistry. Plenum Press, New York, 1997.
4. Shigematsu K., McGeer P.L. Brain Res., 593, 1992, p. 117.
5. Itzhaki R.F. Molecular Neurobiology, 1994, 9, p. 1.
6. Galoyan A.A. Neurochem. Res., 2000, 25, 9/10, p. 1343.
7. Muller N. Nervenarzt, 1997 Jan, 68 (1): 11.
8. Xiao B. G., Link H. Neuroreport, 1998 May 11, 9(7): 1487.
9. Lemke R., Hartig W., Rossner S. et al. J. Neurosci. Res., 1998 Jan 15, 51(2): 223.
10. Schneider H., Pitossi F., Balschunn D. et al. Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 1998 Jun 23, 95(13): 7778.
11. Kamikawa H., Hori T., Nakane H., Aou S., Tashiro N. Am. J. Physiol., 1998 Sep, 275(3pt2): 12803.
12. Lacosta S., Merali Z., Anisman H. Psychopharmacol., (Berl.) 1998 Jun, 137(4): 351.
13. Zalzman S., Murray L., Dyck D.G. et al. Brain Res., 1998 Nov 16, 811(1-2): 111.
14. Muller T., Blum-degen D., Przuntek H., Kuhn W. Acta Neurol.Scand., 1998 Aug, 98(2): 142.
15. McCann S.M., Kimura M., Karanth S. Yu Wa, Rettori V. Ann. N.Y.Acad.Sci., 1998 May 1840: 174.
16. Wen T.C., Tanakaj, Peng H., Desaki J. et al. J. Exp. Med., 1998 Aug 17, 188(4): 635.
17. Tabira T., Chui D.H., Fan J.P. et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1998 May 1: 840.
18. Ho Ai, Blum M. J. Neurosci., 1998 Aug 1, 18(15): 5614.
19. Kabiersch A., Furukawa H., Del Rey A., Besedovsky H.O. Ann. N.Y. Acad.Sci. 1998 May 1, 840: 123.
20. Pauli S., Linthorst A.C., Reul J.M. Eur. J. Neurosci., 1998 Mar, 10(3): 868.
21. Johnson H.M., Tozres B.A. Prog. Allergy, 1998, 43: 37.
22. Karlsson K., Farlund M., Johansson A. et al. J. Neurol. Sci., 1997 Mar 20, 147(1): 43.
23. Muller N. Nervenarzt., 1997 Jan, 68(1): 11.
24. Hornberg M., Arolt V., Wilke L., Kruse A., Kirchner H. Schisophrt. Res., 1995 May, 15(3): 237.
25. linthorst A.L., Reul J.M. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1998 May 1, 840: 139.
- * 26. De Luigi A., Terreni L., Sivoni M., De Simoni M.G. Neuroscience, 1998 Apr 83, (4): 245.