

## ЭНДОРФИНЫ И НЕЙРОТЕНЗИН ПРИ ХОРЕЕ ГЕНТИНГТОНА

Н.Н.НИКОЛЬСКАЯ, Т.С.КОРШУНОВА, Н.Ю.НИКИТЕНКО, И.А.ИВАНОВА-СМОЛЕНСКАЯ,

НИИ неврологии РАМН, Москва

Исследована концентрация альфа-, бета-, гамма-эндорфинов и нейротензина в плазме крови и бета-эндорфина в спинно-мозговой жидкости 48 больных различными формами хорее Гентингтона. Применяли две модификации радиоиммунного метода. Обнаружено выраженное снижение концентрации всех изучавшихся нейропептидов в жидкостях больных. Наиболее отчетливые изменения в концентрации бета-эндорфина в спинно-мозговой жидкости больных отмечены при акинетико-ригидной форме заболевания, характеризующейся снижением активности дофаминергических систем. Обсуждается связь выявленных изменений с основными клинико-биохимическими нарушениями при хорее Гентингтона.

Хорея Гентингтона (ХГ) является одним из наиболее тяжелых прогрессирующих наследственных заболеваний нервной системы с аутосомно-доминантной передачей и характеризуется распространенным хореическим гиперкинезом и деменцией [1]. Несмотря на существенные успехи молекулярной генетики, приведшие в 1993 г. к идентификации гена ХГ [2, 3], механизм преимущественного поражения структур экстрапирамидной системы мозга, в первую очередь striatum, при этом тяжелом страдании до настоящего времени не известен. В то же время многочисленными исследованиями выявлен дисбаланс центральных нейротрансмиттеров — ацетилхолина, гамма-аминомасляной кислоты, глутаминовой кислоты, а также дофамина, норадреналина, серотонина [4, 5, 6, 7].

В последние годы внимание исследователей ХГ привлек новый класс биорегуляторов — нейропептиды, играющие медиаторную и/или модуляторную роль в функционировании экстрапирамидной системы.

В связи с тем, что роль нейропептидов при ХГ изучена недостаточно, а значение их в проявлении различных фенотипов болезни неизвестно, целью нашей работы явилось изучение содержания ряда нейропептидов в биологических жидкостях при различных клинических формах ХГ.

**Методика.** Под наблюдением находилось 48 больных ХГ (22 мужчин, 26 женщин, средний возраст 32,2 года). 42 больных страдали гиперкинетической формой, 6 — акинетико-ригидной юношеской формой ХГ. У всех больных подтвержден семейный характер заболевания с доминантным типом наследования.

Оценка интеллектуально-мнестических функций проводилась по шкале Folstein в нашей модификации [8].

Исследование содержания бета-эндорфина в спинномозговой жидкости (СМЖ), а также альфа-, бета-, гамма-эндорфина и нейротензина в крови 48 больных с различными формами ХГ проведено методом радиоиммунного анализа. Применяли две модификации радиоиммунного метода. Определение содержания бета-эндорфина в ликворе, а также нейротензина в плазме крови проводили с применением стандартных наборов реактивов, выпускаемых фирмой "Immuno Nuclear Corporation" (США), обозначаемое в таблицах как метод "INC". Кроме этого, определение альфа-, бета-, гамма-эндорфина в плазме крови и бета-эндорфина в СМЖ проводили методом радиоиммунного анализа с использованием высокоспецифичных антисывороток к опиоидным пептидам, методика получения которых разработана Дмитриевым и соавт. [9], обозначаемое в таблицах как метод "Д". В работе использовали антисыворотки к синтетическим альфа-, бета- и гамма-эндорфинам, полученные путем многократной иммунизации кроликов олигопептидами, которые были ковалентно связаны с бычьим сывороточным альбумином обработкой бис-диазотированным бензидином. Антисыворотки применяли для радиоиммунологического определения пептидов в конечном разведении от 1:4000 до 1:48000. Все антисыворотки характеризовались высокой специфичностью и давали минимальную перекрестную реакцию с бета-липотропином (6,0%). Порог чувствительности обоих методов — не менее 10 пг исследуемых соединений в пробе. Радиоактивность определяли на программируемом счетчике "Gamma 4000" фирмы "Beckman".

Образцы крови объемом 10 мл у пациентов брали натощак в одно и то же время (9-10 часов утра) из локтевой вены в пробирки, охлажденные до 0°C и содержащие 0,2 мл 0,5 М ЭДТА. Кровь центрифугировали при охлаждении в течение 20 мин при 3000 об/мин (0°C). Полученную плазму разливали в пластиковые пробирки по 1,0 мл, замораживали в жидком азоте и хранили в лабораторном рефрижераторе при температуре -30°C. Отбор ликвора осуществляли по общепринятой методике без новокаиновой блокады, проводя обезболивание участка прокола хлорэтиленовым аэрозолем. Полученные образцы ликвора хранили в жидком азоте.

Исследование начинали не ранее, чем через одну неделю с момента последнего приема лекарственных препаратов. Перед проведением радиоиммунологического исследования образцы размораживали при 0 °C и центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием критерия Стьюдента и коэффициента ранговой корреляции по методу Спирмена и Кэндала [10].

В качестве контроля исследовали ликвор, полученный у 14 неврологически здоровых пациентов хирургических стационаров аналогичного возраста, оперированных с применением спинномозговой анестезии, и кровь 34 практически здоровых лиц.

**Результаты и обсуждение.** Содержание бета-эндорфина в ликворе пациентов с различными формами ХГ представлено в таблице 1. В целом у больных обнаружено снижение уровня бета-эндорфина в ликворе при исследовании двумя вышеуказанными методами. Абсолютные количества концентрации бета-эндорфина в СМЖ, определяемые по методу "Д", были значительно меньше, чем по методу "INC", а их снижение у больных по сравнению с контролем было более выраженным (в 1,9 раза). Вероятно, это обусловлено меньшей величиной перекрестной реакции антисыворотки с липотропином в методе "Д" (6%) по сравнению с методом "INC" (50%), что свидетельствует о более высокой специфичности первого метода.

Содержание бета-эндорфина в спинномозговой жидкости

Таблица 1

Форма ХГ	Содержание в СМЖ (пмоль/л, М±б)	
	Метод "INC"	Метод "Д"
Гиперкинетическая	19,7±1,35 n=13	10,61±0,92 n=31
Акинетики-ригидная		5,24±0,75 n=4
Обе формы ХГ		10,03±0,75 n=35
Контрольная группа	26,51±0,93 n=6	21,16±3,21 n=14

Примечание: здесь и в табл. 2  $p < 0,001$  относительно контроля.

Уровень бета-эндорфина в СМЖ при акинетики-ригидной форме заболевания по методу "Д" составил  $5,24 \pm 0,75$  пмоль/л, а при классической гиперкинетической форме —  $10,61 \pm 0,92$  пмоль/л. Различие является статистически достоверным ( $p < 0,001$ ).

Результаты исследования концентрации нейропептидов в плазме крови содержатся в таблице 2. В плазме крови больных также обнаруживается сниженный уровень опиоидных пептидов. Содержание альфа-эндорфина составило  $21,04 \pm 1,88$  пмоль/л; бета-эндорфина —  $47,35 \pm 1,99$  пмоль/л; гамма-эндорфина —  $1,94 \pm 0,13$  пмоль/л при норме соответственно  $40,36 \pm 3,56$  пмоль/л;  $72,95 \pm 5,42$  пмоль/л;  $4,54 \pm 0,55$  пмоль/л.

Концентрация нейротензина в плазме крови была достоверно снижена при гиперкинетической форме ХГ ( $72,21 \pm 2,73$  пг/мл в контроле  $87,55 \pm 3,37$  пг/мл).

Проведенное сопоставление уровней бета-эндорфина в ликворе с основными клиническими характеристиками с помощью расчета ранговой корреляции показало, что имеется достоверная отрицательная корреляция уровня бета-эндорфина в ликворе со степенью интеллектуально-мнестических нарушений (коэффициент корреляции по Спирмену составлял -0,3365). Более выраженным изменениям соответствовал меньший уровень бета-эндорфина. Значимых корреляций с другими клиническими симптомами получено не было.

В литературе продемонстрирована важная роль нейропептидов в функционировании ЦНС [11, 12]. Большая часть работ посвящена энкефалинам и эндорфинам. Пока-

зано, что помимо участия в механизмах восприятия боли, долговременной памяти, поведенческих реакций опиоидные пептиды играют регуляторную роль в процессе контроля двигательных функций, осуществляемого структурами экстрапирамидной системы. Так, самая высокая концентрация энкефалинов и наибольшая плотность рецепторов эндорфинов в мозге обнаружена в базальных ганглиях, образующих стриопаллидарный комплекс [13].

Содержание эндорфинов и нейротензина в плазме крови

Таблица 2

Форма ХГ	Нейропептиды			Нейротензин (пг/мл)
	Эндорфины (пмоль/л)			
	Альфа	Бета	Гамма	
Гиперкинетическая	20,72±1,29 n=33	47,35±1,99 n=16	1,97±0,16 n=28	72,21±2,73 n=9
Акинетикоригидная	23,18±2,90 n=5		1,78±0,26 n=5	
Все формы ХГ	21,04±1,88 n=38		1,94±0,13 n=33	
Контрольная группа	40,36±3,56 n=17	72,95±5,42 n=6	4,54±0,55 n=10	87,55±3,37 n=8

Установлено, что в структурах экстрапирамидной системы происходит контакт опиоидэргических нейронов с терминалями дофаминэргических нейронов, при этом в первую очередь ингибируется высвобождение дофамина, а также других медиаторов — субстанции Р, ацетилхолина, норадреналина, ГАМК. По этой причине эндогенные опиоиды рассматриваются как нейромодуляторы различных видов синаптических потенциалов, а в ряде случаев выступают в качестве гипотетических нейромедиаторов [14].

В последнее десятилетие большое внимание уделяется центральному эффектам нейротензина, в частности роли этого тридекапептида в осуществлении специфических нейрональных функций экстрапирамидной и лимбической систем [15, 16, 17].

К настоящему времени экспериментально установлены две группы фактов — тесная связь нейротензина с дофаминовой передачей и участие пептида в механизме действия нейролептиков. Особенно высокое содержание нейротензина характерно для дофаминэргических областей мозга, при этом пресинаптические рецепторы нейротензина на дофаминэргических терминалях имеются в нигростриарной системе, тогда как в мезолимбической системе рецепторы этого пептида являются, по-видимому, постсинаптическими. Следует отметить, что между постсинаптическими рецепторами дофамина и нейротензина существует интрамембранная обратная связь, благодаря которой обеспечивается тормозной контроль дофаминэргической передачи [17].

В нейрофармакологических исследованиях показано, что многие эффекты центрально введенного нейротензина подобны эффектам нейролептических препаратов, активирующих пресинаптические дофаминэргические нейроны, что позволило постулировать положение о “нейролептической” роли этого пептида в центральной нервной системе подобно опиоидной активности эндогенных морфинов [16].

При ХГ — заболевании, характерным проявлением которого является нейрональная дегенерация базальных ганглиев и коры головного мозга, исследование роли нейропептидов в механизмах развития патологического процесса привлекает большое внимание исследователей. Большая часть сведений по этому вопросу получена в работах, проведенных *postmortem*. Выявлено снижение концентрации мет-энкефалина, субстанции Р, ангиотензина в структурах, селективно подвергающихся дегенерации при ХГ [11, 18, 19]. В то же время отмечено значительное повышение содержания соматостатина в базальных ганглиях [1, 4, 20], однако в СМЖ больных и их клинически здоровых родственников уровень этого пептида был снижен [4, 6]. Обнаружено также умеренное увеличение содержания тиролиберина и уменьшение кортиколиберина в базальных ганглиях и нейротензина в хвостом ядре [11, 19].



В нашей предыдущей работе [21] был выявлен низкий уровень мет-энкефалина в ликворе больных ХГ. Позже было также продемонстрировано снижение концентрации проэнкефалина в СМЖ больных [22].

В настоящем исследовании впервые проанализирован количественный спектр альфа-, бета-, гамма-эндорфинов и нейротензина в биологических жидкостях больных ХГ. Обнаружено снижение концентрации всех исследованных нейропептидов в биологических жидкостях больных. Данные, полученные по методу "INC", указывают на снижение суммарной концентрации бета-эндорфина и липотропина (перекрестная реакция 50%). В то же время применение более специфического метода [9] позволяет нам утверждать, что снижение касается в основном бета-эндорфина, поскольку наиболее выраженные изменения отмечались при использовании этой модификации радиоиммунного метода.

Обнаруженное нами снижение концентрации бета-эндорфина в ликворе больных вероятно отражает потерю эндорфиносодержащих нейронов в структурах ЦНС больных.

Достоверная корреляция уровня бета-эндорфина в ликворе с выраженностью интеллектуально-мнестических нарушений является дополнительным доказательством участия бета-эндорфина в высшей интегративной деятельности мозга.

Выявление разницы в концентрации бета-эндорфина в СМЖ при гиперкинетической и акинетико-ригидной форме заболевания свидетельствует о том, что клинический полиморфизм находит отражение в биохимическом полиморфизме.

Известно, что в биохимических механизмах хореического гиперкинеза большое значение имеет повышение функциональной активности экстрапирамидной дофаминэргической системы. В то же время при акинетико-ригидной форме наблюдается снижение активности дофаминэргических систем [4, 7]. Поскольку дофамин ингибирует высвобождение бета-эндорфина [11], снижение концентрации этого пептида в СМЖ больных при гиперкинетической форме заболевания в определенной мере может быть обусловлено относительной активацией дофаминэргической передачи. Однако более значительное снижение бета-эндорфина при акинетико-ригидной форме указывает на сложный характер взаимодействия между бета-эндорфином и нарушением дофаминэргической регуляции.

Если бета-эндорфин является типичным опиоидным пептидом, то у альфа- и гамма-эндорфинов опиоидная активность выражена слабо. Гамма-эндорфин также, как и нейротензин, проявляет нейролептические свойства, а альфа-эндорфин является стимулятором эмоционального поведения и двигательной активности [11]. Снижение их уровня в крови больных ХГ представляет интерес, поскольку помимо нарушения двигательных функций при этом заболевании отмечаются грубые нарушения интеллектуально-мнестических функций и эмоционально-волевой сферы. В то же время в экспериментальных исследованиях показано, что модулирующее влияние нейропептидов на высшие интегративные функции мозга зависит от функционального состояния моноаминэргических систем [23], существенно нарушенных при ХГ.

В нашей работе обнаружено снижение концентрации нейротензина в плазме крови при гиперкинетической форме заболевания. Как уже указывалось, нейротензин тесно связан с дофаминовой системой мозга [24]. По-видимому, между этими двумя регуляторами существуют антагонистические отношения. Экспериментально установлено, что НТ оказывает ингибиторное действие на индуцируемую дофамином двигательную активность, а через афферентные дофаминэргические терминали осуществляется понижающая регуляция количества рецепторов нейротензина [17]. Следует отметить, что снижение уровня нейротензина было обнаружено и в биологических жидкостях больных шизофренией, где также отмечается гиперактивность дофаминэргического нейрона, при этом лечение нейролептиками приводило к стойкому увеличению концентрации нейротензина в ликворе больных еще до клинического улучшения [25].

В то же время при другом экстрапирамидном заболевании, характеризующимся снижением концентрации дофамина в базальных ганглиях — болезни Паркинсона, отмечено снижение плотности рецепторов нейротензина в черной субстанции [26]. Системное или внутримозговое введение НТ экспериментальным животным с селективной дегенерацией нигростриарного дофаминэргического пути сопровождалось повышением содержания метаболитов дофамина в подкорковых структурах, а также уменьшением мышечной ригидности и тремора [27].

При сенильных деменциях, болезни Альцгеймера — состояниях, связанных как и ХГ с прогрессирующим снижением интеллекта, отмечается потеря рецепторов нейротензи-

на и опиоидных рецепторов в коре головного мозга [28, 18, 29]. По-видимому, нейротензин модулирует ряд нейрохимических процессов в физиологических и патологических условиях, связанных как с ингибированием, так и со стимуляцией дофаминэргической передачи. Снижение концентрации нейротензина в крови больных, выявленное в нашей работе у больных с гиперактивностью дофаминэргического нейрона, свидетельствует в пользу гипотезы об антагонистических отношениях этих двух регуляторов.

Возможно, снижение содержания большинства нейропептидов в структурах мозга и биологических жидкостях является общим биохимическим признаком дегенеративных заболеваний нервной системы.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлено снижение альфа-, бета-, гамма-эндорфина и нейротензина в биологических жидкостях больных ХГ. Применяемая в настоящее время заместительная терапия дофа-содержащими препаратами при акинетики-ригидных формах и антагонистами дофамина при гиперкинетических формах возможно явится примером для разработки в перспективе препаратов, воздействующих на систему модуляторов-нейропептидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Folstein S.E. Huntington's disease, a disorder of families. — J. Hopkins University Press, Baltimore, London, 1989.
2. Иванова-Смоленская И.А., Верещагин Н.В., Иллариошкин С.Н. // Жур. невропатол. и псих. им. С.С.Корсакова. — 1995. — Т. 95, N 1. — С. 52-57.
3. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. Cell. — 1993. — V. 72. — P. 971-983.
4. Бархатова В.П. Нейротрансмиттеры и экстрапирамидная патология. — М., —1988.
5. Kieburz K.D., McDermott M., Marshall E. // 47 Annual Meeting American Academy of Neurology. — 1995, P. 384.
6. Martin J.B. Huntington's Disease. N. // Engl. J. Med. — 1986. — V. 13, N 315 (20). — P. 1267-1276.
7. McYeer E., Kremer B., Hayden M. // Bopl. Psych. — 1993. — V. 33. — P. 551-553.
8. Никольская Н.Н. // Фенотипический полиморфизм хореи Гентингтона (клинико-генеалогические, клинико-электрофизиологические, клинико-биохимические сопоставления). — Дис. канд. мед. наук. — М., 1993. — С. 32.
9. Дмитриев А.Д., Голикова Ю.И., Кобылянский А.Г. // Нейрохимия. — 1982. — N 1. — С. 66-74.
10. Каминский Л.С. // Медицинская и демографическая статистика. — М., 1974.
11. Ашмарин И.П., Каменская М.А. // Итоги науки и техники. Серия: "Физиология человека и животных". М., ВИНТИ. — 1986. — Т. 34. — С. 184.
12. Слепушкин В.Д., Золотов Г.К., Виноградов В.А., Тутов М.И. // Нейропептиды. Их роль в физиологии и патологии. — Томск, — 1988.
13. Yang H.Y., Hong J.S., Costa E. // Neuropharmacology. — 1977. — V. 16. — P. 303-307.
14. "The endorphins", ed. by E. Costa, M. Trabucchi // New York, 1978.
15. Elliot P.J., Nemeroff C.B. in: The neurobiology of neurotensin in Neural and Endocrine Peptides and Receptors. — Pl. Press. N.Y., 1986. — P. 219.
16. Levant B., Nemeroff C.B. The psychobiology of neurotensin // "The Neuroendocrinology of Mood: Current Topics in Neuroendocrinology", ed by Ganten D., Pfaff D. — Berlin, 1988. — V. 8. — P. 265.
17. Nemeroff C.B., Cain S.T. Trends Pharmacol Sci. — 1985. — V. 6, N 2. — P. 201-205.
18. Seizinger B.R., Liebiseh D.C., Kish S. // J. Brain Res. — 1986. — V. 378, N 2. — P. 405-408.
19. Zech M., Bogerts B. // Acta neuropathol. — 1985. — V. 68, N 1. — P. 32-38.
20. Ferrante R.J. // Neurosci Lett. — 1986. — V. 71, N 3. — P. 283-288.
21. Коршунова Т.С., Колий Г.А., Ларский Э.Г. // Журн. невроп. и психиатр. им. Корсакова. — 1984. — Т. 84, вып. 7. — С. 1061-1064.
22. Jadarola M., Mouradian M. // Brain Res. — 1989. — V. 489, N 2. — P. 397-401.
23. Дубровина Н.И. // Бюлл. exper. биол. и мед. — 1995. — Т. 119, N 2. — С. 120-124.
24. Struble R., Powers R.E., Casanova M.F. // J. Neuropathol. and Experim. Neurol. — 1987. — V. 46, N 5. — P. 567-584.
25. Garver D.L., Bissette G., Gao J.K. // Am. J. Psych. — 1991. — V. 148, N 4. — P. 484-488.
26. Rinne W.K., Rinne J.O., Rinne J.K. // Med. Biol. — 1987. — V. 62, N 2-3. — P. 75-81.
27. Jolice F., Rivest R., St.-Pierre et al. // Brain Res. — V. 538, N 2. — P. 187-192.
28. Jokkonen J., Hartikainen P., Soikkeli R. // Neuropeptides. — 1991. — V. 19, N 2. — P. 97-102.
29. Tassin J.P. // Encephale. — V. 15. — N 5. — P. 465-470.

#### ENDOORPHINES AND NEUROTENSIN IN HUNTINGTON'S DISEASE

N.N. Nikolskaya, T.S. Korshunova, N.Yu. Nikitenko, I.A. Ivanova-Smolenskaya

Institute of Neurology RAMS, Moscow

Concentration of  $\alpha$ -endorphine,  $\beta$ -endorphine,  $\gamma$ -endorphine and neurotensin in blood and  $\beta$ -endorphine in cerebrospinal fluid of 48 patients with various forms of Huntington's disease was measured. Two modifications of immunoassay were used. The level of all neuropeptides studied was significantly decreased. Patients with akinetiko-rigid form of the disease showed a two-fold lowering in  $\beta$ -endorphine levels in cerebrospinal fluid in comparison with patients with the classic form. The relationships between these findings and clinical — biochemical characteristics of Huntington's disease are discussed.