

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616-097 - 616-008.84 - 616.858

© Коллектив авторов

СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА, ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА И АУТОАНТИТЕЛ К НИМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

И.Е.Грибова¹, Б.Б.Гнеденко¹, В.В.Полещук², С.Г.Морозов^{1,3}

¹ГУ ГKB № 29 Департамента здравоохранения Москвы,
111020, Москва, Госпитальная площадь, д.2; тел.: (095)263-16-28;
факс: (095)263-05-30; эл. почта: biopharm@iname.com

²НИИ неврологии РАМН, Москва.

³ГУ НИИ биомедицинской химии им В.Н.Ореховича РАМН, 119121, Москва.

Методом твердофазного ИФА изучали сыровоточные уровни фактора некроза опухоли альфа (ФНО α), интерферона-гамма (ИФН γ) и аутоантител (а-АТ) к ним при болезни Паркинсона (БП). Выявлено повышение уровня ФНО α и ИФН γ в сыворотке крови у 50% и 35% пациентов с БП соответственно. Обнаружено достоверная корреляция между уровнем ФНО α и тяжестью неврологической симптоматики ($r=0,434$; $p<0,05$), между уровнями ИФН γ и возрастом начала заболевания ($r=0,4511$, $p<0,05$), а так же возрастом больных ($r=0,4358$, $p<0,05$). Показано увеличение уровней а-АТ к ФНО α при БП по сравнению с группой контроля. Отмечено сочетанное повышение уровней а-АТ к ФНО α и ИФН γ ($r=0,91$, $p<0,001$), достоверную обратную корреляцию между длительностью болезни и уровнями а-АТ к ИФН γ и ФНО α ($r=-0,4644$ и $r=-0,606$ соответственно, $p<0,01$). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении ФНО α , ИФН γ в патологический процесс при БП.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли-альфа, интерферон-гамма, аутоантитела, болезнь Паркинсона.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы получен ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о роли провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1, ИФН γ в дегенерации дофаминергических нейронов в условиях эксперимента [1-3]. Имеются сведения об увеличении секреции мононуклеарами периферической крови ИЛ1, ИЛ6, ФНО у пациентов с болезнью Паркинсона (БП) [4, 5]. На основании этих данных можно предположить, что эти цитокины могут участвовать в патогенезе данного заболевания.

В последние годы накоплен значительный материал по аутоантителам (а-АТ) к провоспалительным цитокинам ФНО α , ИФН γ [6, 7] в основном при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях [8-12]. Данных об изучении а-АТ к провоспалительным цитокинам при БП, в доступной литературе нет. В то же время, есть основания полагать, что комплексное изучение содержания ФНО α , ИФН γ и а-АТ к ним при БП позволит выявить клинико-иммунологические корреляции, позволяющие глубже понять патогенез данного заболевания.

ЦИТОКИНЫ И АУТОАНТИТЕЛА ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Цель данной работы состояла в изучении сывороточных уровней интерферона-гамма (ИФН γ) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО α) и а-АТ к ним в сыворотке крови пациентов с БП.

МЕТОДИКА. Определение уровней исследуемых цитокинов и антител к ним проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для определения сывороточных уровней ФНО α использовали набор реагентов ProCon TNF α (ООО "Протеиновый контур", Россия). Для определения сывороточных уровней ИФН γ использовали набор реагентов фирмы "Amersham Pharmacia Biotech" (Англия). Постановку ИФА проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Для определения уровней аутоантител (а-АТ) к ФНО α и ИФН γ были разработаны стандартные твердофазные иммуноферментные тест-системы. На полистироловые планшеты для ИФА фирмы "Nunc" (Дания) наносили соответственно ФНО α и ИФН γ (производства ГНЦПИ МЗ РФ, Россия) в разведении 100 нг/мл по 100 мкл в лунку. После 18-часовой инкубации при 4°C проводили блокировку 0,05% желатином 1 час при 38°C и трижды отмывали фосфатным буфером, содержащим 0,1% твин-20. Затем в лунки вносили по 100 мкл исследуемой сыворотки, разведенной в PBST (phosphate buffered saline with tween) 1:200. Каждую сыворотку исследовали в двух повторях. В контрольные ячейки вносили образцы эталонной сыворотки в том же разведении. В качестве эталонной использовали пулированную сыворотку 70 здоровых доноров. Планшеты инкубировали 18 ч при 4°C, трижды отмывали как описано выше, добавляли в лунки антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000 (ООО "Имтэк", Россия), инкубировали в течение 1,5 ч при 38°C, и вновь отмывали. Реакцию проявляли о-фенилендиамин с добавлением 1% H $_2$ O $_2$. Через 10 мин инкубации в темноте добавляли по 25 мкл 10% серной кислоты в лунку для остановки реакции и измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм на аппарате MRX II ("Dynex Technologies", США). Иммунореактивность исследуемых сывороток определяли в процентах относительно реакции стандарта, выраженной в единицах оптической плотности.

Для построения калибровочных кривых использовали различные разведения образцов сыворотки здоровых доноров. Проверка созданных тест-систем на точность, воспроизводимость и надежность показала, что они обладают такими качествами.

Группа больных с БП составила 27 человек (12 мужчин + 15 женщин, возраст от 44 до 89 лет, средний возраст 65 \pm 10,7 лет). Тяжесть неврологической симптоматики, оцениваемая по шкале UPDRS [13], составила от 48 до 106 баллов (у 13 человек тяжелое течение заболевания, у 12 - средней тяжести, у 2 - легкое течение). Длительность болезни от 1 до 7 лет, средняя продолжительность болезни 5,4 года. Длительность ДОРА-терапии составляла от 1 до 5 лет, пятерым пациентам ДОРА-терапии не проводили. Группа контроля составила 39 человек (20 мужчин + 19 женщин, возраст от 38 до 79 лет, средний возраст 61,5 \pm 11,8 лет). На момент обследования клинические анализы крови и мочи были в пределах нормы. Аутоиммунных, инфекционных и каких-либо неврологических заболеваний в группе контроля выявлено не было.

Проведен корреляционный анализ между уровнями ФНО α и ИФН γ и а-АТ к ним при БП и возрастом начала заболевания, возрастом на момент обследования, длительностью ДОРА-терапии, длительностью болезни и тяжестью неврологической симптоматики.

Полученные данные анализировали с помощью пакета компьютерных программ Biostat (Pimer of Biostatistics Version 4.03). При обсчете результатов использовался метод линейной регрессии и корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Нормальный уровень ФНО α в сыворотке крови, как правило, не превышает 50 пкг/мл, а ИФН γ - 20 пкг/мл. Выявлено повышение уровня ФНО α в сыворотке крови у 50% пациентов с БП, в

отдельных случаях повышение достигало уровня 100-136 пкг/мл. Так же выявлено повышение уровня ИФН γ в 35% случаев у пациентов с БП, в отдельных случаях до 400 пкг/мл. Полученные результаты согласуются с данными Bessler et al. [4] о повышении продукции ФНО α , Ил1 β , Ил6, и снижении продукции Ил2 мононуклеарами периферической крови у пациентов с БП в эксперименте *in vitro*. В то же время имеются противоположные данные о том, что в экспериментах *in vitro* с клетками крови пациентов с БП снижена продукция ФНО α , Ил1 α , Ил1 β , Ил6 мононуклеарами и продукция ИФН γ ЛПС-стимулированными, мононуклеарами по сравнению с клетками крови здоровых доноров [14].

Не выявлено корреляций между уровнями ФНО α и ИФН γ при БП. При проведении корреляционного анализа уровней цитокинов с клиникой выявлена достоверная корреляция между сывороточным уровнем ФНО α и тяжестью неврологической симптоматики ($r=0,434$; $p<0,05$) (табл. 1). Этот результат можно считать в какой-то степени закономерным. Рядом авторов, изучавших содержание ФНО α в ЦНС, отмечается повышение уровней этого цитокина в стриатуме, черной субстанции и спинномозговой жидкости при БП [4,15]. Иммуногистохимическими методами обнаружено повышенное содержание данного цитокина в глиальных клетках черной субстанции. Поскольку ФНО α обладает цитотоксической активностью, был сделан вывод о том, что он может принимать участие в дегенеративных процессах, наблюдающихся при БП [15]. Более того, выявлена повышенная чувствительность дофаминергических нейронов черной субстанции к продукции ФНО α , что может усугублять нейродегенеративный процесс при данном заболевании [15]. Корреляции между сывороточными уровнями ФНО α и длительностью болезни не выявлено.

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между уровнями ФНО α , ИФН γ , сывороточными а-АТ к ним (АФНО α , АИФН γ) у пациентов с болезнью Паркинсона и некоторыми клиническими параметрами.

Клинические параметры	ФНО α	АФНО α	ИФН γ	АИФН γ
UPDRS	0,434 *	-0,156	-0,040	-0,302
Длительность болезни	-0,253	-0,604**	-0,042	-0,464**
Длительность ДОПА-терапии	-0,317	-0,545*	-0,096	-0,312
Возраст на момент обследования	0	-0,247	0,436*	-0,382
Возраст начала заболевания	0,048	-0,124	0,451*	-0,295

Примечание: достоверность корреляций между уровнями цитокинов и аутоантител к ним и клиническими параметрами: ** - $p<0,01$, * - $p<0,05$

Обнаруженная нами корреляция между уровнями ИФН γ и возрастом начала заболевания ($r=0,4511$, $p<0,05$), а так же между уровнями ИФН γ и возрастом больных ($r=0,4358$, $p<0,05$), позволяет предположить, что при старении возрастные изменения в организме влекут за собой нарушения различных систем, в том числе иммунной системы. Это в свою очередь может приводить к снижению толерантности к воспалительным реакциям, и, как следствие, возрастанию уровня воспалительных цитокинов (например, ИФН γ) при БП.

При БП отмечено увеличение уровней а-АТ к ФНО α по сравнению с группой контроля ($130,3\pm 11,92$ и $105,3\pm 4,62$ соответственно, $p<0,05$). Увеличение уровней а-АТ к ИФН γ при указанной выборке оказалось недостоверно ($133,4\pm 11,82$ и $117,2\pm 8,23$ соответственно). Однако, отмечается сочетанное повышение уровней а-АТ к ФНО α и ИФН γ ($r=0,91$, $p<0,001$) (рис.).

Обратная корреляция между длительностью болезни и уровнями а-АТ к ИФН γ и ФНО α ($r=-0,4644$ и $r=-0,606$ соответственно, $p<0,01$), вероятно, связана с

ЦИТОКИНЫ И АУТОАНТИТЕЛА ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

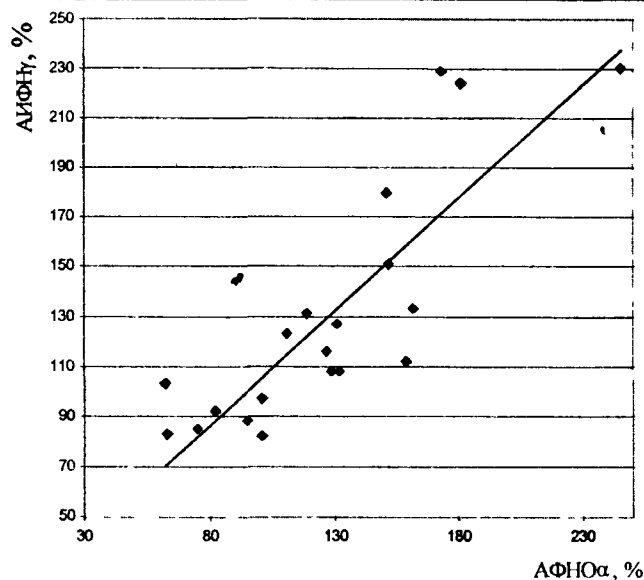


Рисунок.
Соотношение уровней аутоантител к ИФН γ и ФНО α при болезни Паркинсона.
(Уровни а-АТ определяли в процентах относительно реакции стандарта).

истощением компенсаторных возможностей организма нейтрализовать провоспалительные цитокины. Корреляция между длительностью ДОРА-терапии и снижением уровней а-АТ к ФНО α и ИФН γ ($r=-0,545$, $p<0,05$ и $r=-0,312$, $p>0,05$ соответственно) может быть связана с тем, что длительно болеющие пациенты в течении более длительного времени принимают L-DOPA.

Корреляции между уровнями цитокинов и антител к ним при БП не выявлено, в отличие от данных других исследователей об обратной зависимости между уровнями цитокинов и антител к ним при других заболеваниях [6, 8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении ФНО α , ИФН γ и аутоантител к ним в патологический процесс при БП, хотя механизм их взаимодействия до сих пор во многом не изучен.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Nagatsu T., Mogi M., Ichinose H., Togari. A. (2000) J. Neural Transm. Suppl., **58**, 43-51.
2. Mogi M., Togari A., Tanaka K., Ogawa N., Ichinose H., Nagatsu T. (1999) Neurosci. Lett., **268**, 101-104.
3. McGuire S.O., Ling Z.D., Lipton J.W., Sortwell C.E., Collier T.J., Carvey P.M. (2001) Exp. Neurol., **169**, 219-230.
4. Bessler H., Djaldetti R., Salman H., Bergman M., Djaldetti M. (1999) Biomed. Pharmacother., **53**, 141-145.
5. Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K., Nagatsu T. (1994) Neurosci. Lett., **165**, 208-210.
6. Elkarim R.A., Dahle C., Mustafa M., Press R., Zou L.P., Ekerfelt C., Ernerudh J., Link H., Bakhiat M. (1998) Clin. Immunol. Immunopathol., **88**, 241-248.
7. Elkarim R.A., Mustafa M., Link H., Bakhiat M., Ekerfelt C., Vrethem M., Ernerudh J. (1999) Hum. Antibodies., **9**, 55-60.

8. El Karim R., Granert S., Lindquist L., Link H., Bakhiet M. (1999) *Infect. Immun.*, **67**, 3051-3054.
9. Madariaga L., Amurrio C., Martin G., Garcia-Cebrian F., Bicandi J., Lardelli P., Suarez M.D., Cisterna R. (1998) *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **2**, 62-68.
10. Bakhiet M., Diab A., Mahamustafa, Jiezhu, Lindquist L., Link H.O. (1997) *Infect. Immun.*, **65**, 3300-3303.
11. Barrett S.P., Gleeson P.A., de Silva H., Toh B.H., van Driel I.R. (1996) *Eur. J. Immunol.*, **26**, 1652-1655.
12. Xiang M., Zacccone P., Di Marco R., Harris R., Margo G., Di Mauro M., Meroni P.L., Garotta G., Nicoletti F. (1999) *Autoimmunity*, **30**, 71-80.
13. Fahn S., Elton R.L. (1987) in *Recent developments in Parkinson's disease*. (Fahn S., Marsden C.D., Calne D.B., Goldstein M., eds), *Health Care Information*, **2**, pp.153-163.
14. Hasegawa Y., Inagaki T., Sawada M., Suzumura A. (2000) *Acta Neurol. Scand.*, **101**, 159-164.
15. Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E.C. (1994) *Neurosci. Lett.*, **172**, 151-154.

Поступила 20.11.02

CONTENT OF INTERFERON-GAMMA, ALPHA TUMOR NECROSIS FACTOR AND AUTOANTIBODIES TO THEM IN BLOOD SERUM DURING PARKINSON'S DISEASE.

I.E.Gribova¹, B.B.Gnedenko¹, V.V.Poleshchuk², S.G.Morozov^{1,2}.

¹29 Municipal Hospital of Moscow Public Health Department, Gospitalnaya Square, 2, 111020, Moscow; tel.: (095) 263-16-28; fax: (095) 263-05-30; e-mail: biopharm@iname.com

²Neurology Research Institute, RAMS, Moscow.

³Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry RAMS, 119121, Moscow.

Serum levels of interferon- γ (IF γ), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and autoantibodies (a-AT) to these cytokines were investigated in patients with Parkinson's disease (PD). The increased levels of TNF α (50%) and IF γ (35%) were found in PD patients. There was close correlation between the serum level of TNF α and the manifestation of neurological symptoms ($r = 0.434$; $p < 0.05$), and between levels of IF γ and the duration of this disease ($r = 0.4511$, $p < 0.05$) and patients age as well ($r = 0.4358$; $p < 0.05$). There was increased level of a-AT to TNF α in PD patients versus healthy controls (130.3 ± 11.92 and 105.3 ± 4.62 , respectively, $p < 0.05$). The combined increase of levels of a-AT to TNF α and IF γ ($r = 0.91$, $p < 0.01$) close reverse correlation between duration of PD and levels of a-AT to TNF α and IF γ ($r = 0.4644$ and $r = 0.606$, respectively, $p < 0.01$) were also recognised. The data obtained suggest the involvement of TNF α and IF γ into the pathological process during PD, which requires further investigation in this direction.

Key words: alpha tumor necrosis factor, interferon-gamma, autoantibodies, Parkinson's disease.