

©Коллектив авторов

РОЛЬ РОСТОВЫХ ПОЛИПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В МЕХАНИЗМЕ ПЛАСТИЧНОСТИ ЦНС У БОЛЬНЫХ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕЙРОНА

М.Г. Соколова^{1}, С.В. Лобзин¹, В.А. Пеннийянен², А.В. Кипенко²,
Е.В. Лопатина², М.В. Резванцев³, А.В. Гавриченко¹*

¹Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург; эл почта: sokolova.m08@mail.ru

²Институт физиологии имени И.П. Павлова, Санкт-Петербург

³Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Синаптический прунинг является физиологическим механизмом нейропластичности, который регулируется через синтез ростовых полипептидных соединений – нейротрофинов. Было проведено клинично-экспериментальное исследование по изучению роли нейротрофинов в механизме синаптического прунинга у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона. Выявлено, что у больных имеет место повышенный уровень регуляторных ростовых полипептидных соединений, который приводит к ингибирующему рост нейритов эффекту в органотипической культуре ткани. Таким образом, гиперэкспрессию нейротрофинов можно рассматривать как фактор, препятствующий синаптическому прунингу и способствующий дальнейшему процессу нейродегенерации в нервной ткани у больных с наследственной патологией периферического двигательного нейрона.

Ключевые слова: синаптический прунинг, ростовые полипептиды, нейротрофины, фактор роста головного мозга (ФРГМ), фактор роста нерва (ФРН), циллиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ), органотипическая культура, сыворотка крови, спинальная мышечная атрофия, наследственная мотосенсорная невропатия

DOI: 10.18097/PBMC20176305453

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основополагающих принципов нейропластичности является феномен синаптического прунинга: в ЦНС постоянно идет процесс разрушения и создания соединений между нейронами. Одним из механизмов, регулирующих данный процесс, является синтез регуляторных ростовых полипептидных соединений – нейротрофинов (НТФ) [1]. Нами была предпринята попытка оценить состояние нейропластичности у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона: спинальная мышечная атрофия I типа и II типа и наследственная мотосенсорная невропатия I и III типа. Эти заболевания относятся к редким нейродегенеративным заболеваниям у детей, характеризуются дегенеративными изменениями периферического двигательного нейрона, приводят к развитию периферических параличей, дыхательной недостаточности и ранней смертности [2]. Для реализации поставленной цели было проведено определение уровня регуляторных ростовых полипептидных соединений в сыворотке крови и исследование физиологической активности данной сыворотки в условиях органотипической культуры ткани. Органотипические культуры применяют для изучения механизмов роста и дифференцировки клеток, гистогенеза, межклеточных и межтканевых взаимодействий, а также изучения способов сохранения жизнеспособности изолированных органов, предназначенных для трансплантации [3]. К настоящему времени хорошо изучены процессы, протекающие при культивировании

спинальных ганглиев: распластывание эксплантатов, морфологическая и функциональная дифференцировка нейронов, рост отростков, пролиферация и миграция глии, гистохимические отличия нервных клеток в культуре и *in vivo* [4]. Для оценки уровня регуляторных ростовых полипептидных соединений были выбраны следующие нейротрофические факторы: фактор роста головного мозга (BDNF), фактор роста нерва (NGF) и циллиарный нейротрофический фактор (CNTF). BDNF участвует в дифференцировке нейронов, созревании и формировании синапсов [5, 6]. NGF является необходимым для дифференцировки нейрональных клеток, роста аксонов и их ветвления [7]. CNTF – фактор, который относится к семейству нейропоэтических цитокинов, рассматривается как ключевой фактор дифференцировки развивающихся нейронов и глиальных клеток [8, 9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было обследовано 25 больных в возрасте 8-12 лет с подтвержденным молекулярно-генетическим анализом диагноза болезнь периферического двигательного нейрона (спинальная мышечная атрофия I типа и II типа (n=18), наследственная мотосенсорная невропатия I и III типа (n=7)). Объектом исследования являлись больные, которым проводилось клинично-неврологическое обследование и сыворотка крови больных. Забор венозной крови, хранение и обработка для выделения сыворотки проводилась стандартными методиками. В дальнейшем сыворотка крови была изучена в органотипической

* - адресат для переписки

культуре ткани и иммуноферментным методом для определения уровня регуляторных ростовых полипептидных соединений. На все проводимые манипуляции были оформлены информированные согласия, которые были представлены на этическом комитете СЗГМУ им. И.И. Мечникова от 10.11.2010. Контрольную группу составляли 30 здоровых детей. Определение уровня BDNF (HGNC ID – HGNC:1033, chromosomal location 11p14.1) и CNTF (HGNC ID – HGNC:2169, chromosomal location 11q12.1) проводили иммуноферментным методом в образцах сыворотки крови с использованием коммерческих иммуноферментных наборов фирмы “RayBiotech, Inc.” (США) в соответствии с инструкциями производителя. Пороговые величины определения BDNF – 20 пг/мл, CNTF – 8 пг/мл.

Исследование влияния сыворотки крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона на рост нейритов проведено на 1800 эксплантатах спинальных ганглиев 10-12-дневных куриных эмбрионов. Эксплантаты культивировали в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония) в течение трёх суток на подложках из коллагена в чашках Петри при 36,5°C и 5% CO₂. Питательная среда содержала 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), глюкозы (0,6%), глутамина (2 мМ), гентамицина (100 ед./мл), 5% куриного эмбрионального экстракта и 10% фетальной сыворотки коровы [10]. Контрольные эксплантаты (300) культивировали в условиях питательной среды стандартного содержания. В экспериментальных чашках в культуральную среду добавляли сыворотку крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона в различном диапазоне разведений. Для визуализации объектов использовали микроскоп AxioStar Plus (“CarlZeiss”, Германия). Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Конфокальная микроскопия” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для количественной оценки роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади всего эксплантата, включая зону роста, к исходной площади [11]. Контрольное значение ИП принимали за 100%.

В ходе исследования применяли следующие процедуры и методы статистического анализа: определение числовых характеристик переменных; оценку соответствия эмпирического закона распределения количественных переменных теоретическому закону нормального распределения по критерию Шапиро-Уилка, оценку значимости различия средних арифметических значений в независимых выборках с использованием t-критерия Стьюдента. Описание количественных признаков было выполнено с использованием среднего арифметического значения и стандартного отклонения. Нулевая статистическая гипотеза отвергалась при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета STATISTICA 8.0 (“StatSoft”, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-генетическая характеристика: нарушения в двигательной сфере у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона проявлялись с рождения. Все больные наблюдались в течение 5 лет, за этот период времени заболевание неуклонно прогрессировало. Клинико-неврологическая картина была представлена вялыми парезами рук и ног с преобладанием процесса в проксимальных отделах, активные движения сохранялись лишь в дистальных отделах рук, мышцах шеи, мимической и дыхательной мускулатуре. Наблюдались фибрилляции и фасцикуляции мышц, выраженная диффузная мышечная гипотония. Были выявлены контрактуры крупных суставов конечностей и выраженный кифосколиоз позвоночника. Функции тазовых органов, чувствительность и интеллект были сохранены.

Данные иммуноферментного анализа свидетельствуют о том, что концентрация BDNF ($36,6 \pm 3,6$ нг/мл) в сыворотке крови больных статистически значимо ($p < 0,05$) выше, чем в контрольной группе ($27,3 \pm 7,2$ нг/мл). Изучение разброса данного показателя выявило, что концентрация BDNF в сыворотке крови контрольной группы находится в диапазоне от 16,0 нг/мл до 42,0 нг/мл, у больных – от 22,5 нг/мл до 64,0 нг/мл. Анализ результатов CNTF в сыворотке крови не обнаружил наличия статистически значимого различия между контрольной и исследуемой группой ($0,02 \pm 0,01$ нг/мл против $0,02 \pm 0,01$ нг/мл соответственно). Выявлено, что концентрация BDNF в сыворотке крови у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона статистически значимо выше, чем в контрольной группе, CNTF не имеет статистически значимого различия между контрольной и исследуемой группой, но значение этого белка находится в пределах возрастной нормы и дефицита его в исследуемой группе не отмечено.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Дальнейшее исследование состояло из серии экспериментов, целью которых было изучение влияния плазмы крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона на рост нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев 10-12-дневных куриных эмбрионов с помощью метода органотипической культуры ткани. Сыворотка крови была исследована в широком диапазоне разведений (1:100–1:2). При разведениях 1:2, 1:10, 1:50 сыворотки больных наблюдали практически полное ингибирование роста нейритов сенсорных ганглиев. При добавлении в культуральную среду сыворотки крови в разведении 1:70 наблюдали достоверное нейрит-ингибирующее действие. ИП исследуемых эксплантатов был ниже контрольных значений в среднем на 25% и составил $75,5 \pm 7,4\%$. Дальнейшее разведение на рост эксплантатов практически не влияло. Результаты оценки ИП для исследуемых разведений проанализированы

с использованием дисперсионного анализа. Показано, что фактор разведения сыворотки крови статистически значимо (критерий Фишера $F=489,2$; $p<0,001$) влияет на значение ИП, регистрируемое в опыте.

Количественная оценка линейной связи показала наличие статистически значимой ($p<0,001$) сильной обратной (коэффициент корреляции Пирсона $r=-0,80$) корреляционной связи между содержанием BDNF в сыворотке крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона и ИП в диапазоне концентраций от 0 до 1,5 нг/мл (рисунок). По аналогичной методике была проанализирована связь между концентрацией CNTF в сыворотке крови у больных и ИП. Количественная оценка линейной связи показала наличие статистически значимой ($p=0,014$) сильной обратной (коэффициент корреляции Пирсона $r=-0,62$) корреляционной связи между содержанием CNTF в сыворотке крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона и ИП в диапазоне концентраций от 0 до 0,005 нг/мл. Таким образом, выявлено, что степень ингибирования роста нейритов спинальных ганглиев куриных эмбрионов коррелирует с показателями концентрации BDNF и CNTF в сыворотке крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование показало, что у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона имеет место повышенный уровень регуляторных ростовых полипептидных соединений – нейротрофинов (BDNF, CNTF). Отсутствие в настоящее время нормативов по содержанию BDNF, CNTF в сыворотке крови связано с тем, что определение BDNF и CNTF носит строго научный характер применения. Необходимо учитывать также,

что разные производители ИФА наборов, требуют проводить оттитровку каждого набор, сопоставляя показатели в группе больных с группой контроля (норма). Однако, определения данных факторов в исследованиях у больных с депрессией (больные – $16,6\pm3,4$ нг/мл; контроль – $13,6\pm3,4$ нг/мл) [12], и детей с гиперактивностью и нарушением внимания (больные – $39,33\pm10,41$ нг/мл; контроль – $38,82\pm8,29$ нг/мл) [13] показывают, что наши результаты сопоставимы с диапазоном концентраций (BDNF). Возможно, усиление синтеза нейротрофинов связано с активацией процессов нейропластичности, направленных на формирование новых полисинаптических связей, так и с онтогенетическими особенностями детского возраста. Однако повышенный уровень нейротрофинов, согласно нашим исследованиям, не приводит к восстановлению или частичной компенсации утраченной двигательной функции у больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона [14]. В эксперименте на органотипической культуре ткани показано, что сыворотка больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона ингибирует рост нейритов сенсорных ганглиев. Выявлена сильная корреляционная связь между фактом ингибирования роста нейритов нейронов сенсорных ганглиев и концентрацией NGF, BDNF и CNTF в сыворотке крови больных. Возможно, вследствие повышенной концентрации регуляторных ростовых полипептидных соединений происходит излишняя стимуляция тиразинкиназных рецепторов и нарушается нормальная работа системы “нейротрофин-рецептор-лиганд” при одновременном и/или перекрестном взаимодействии BDNF, NGF и CNTF с несколькими типами рецепторов. С одной стороны, высокие концентрации в крови НТФ могут указывать на сохранность механизмов нейропластичности у больных, с другой стороны, мы видим, что имеет место ингибирующий эффект

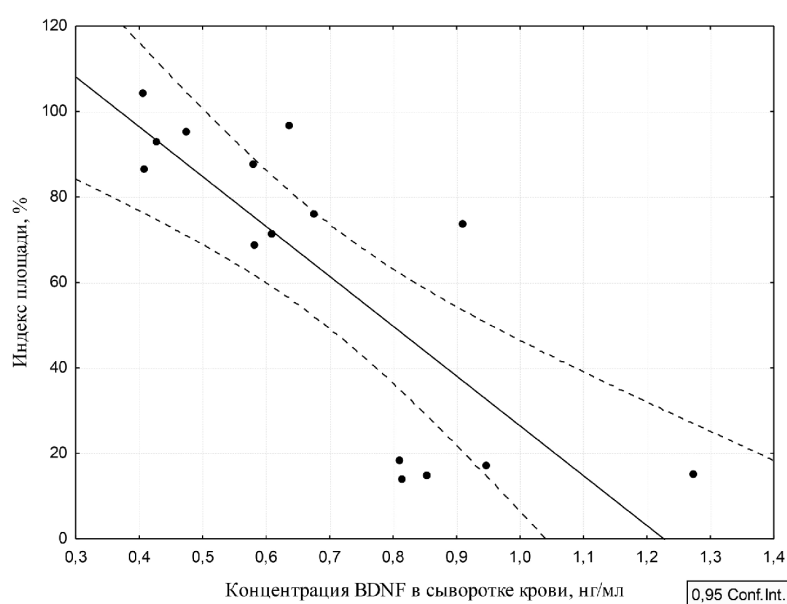


Рисунок. Графическая оценка связи между концентрацией BDNF в сыворотке крови больных наследственной патологией периферического двигательного нейрона: в интервале от 0 до 1,50 нг/мл и ИП.

сыворотки на рост нейритов сенсорных ганглиев. Возможно, больные наследственными заболеваниями периферического нейрона на протяжении 8-14 лет болезни утратили значительную часть популяции α -мотонейронов, вследствие чего концентрация синтезируемых клетками-мишенями НТФ значительно превышает сохраненные рецепторные тирозинкиназные площади. Гиперэкспрессия регуляторных ростовых полипептидных соединений приводит к ингибирующему рост нейритов эффекту, который препятствует синаптическому прунтингу и может рассматриваться скорее как фактор, способствующий дальнейшему процессу нейродегенерации в нервной ткани у больных с наследственной патологией периферического двигательного нейрона.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Blais M., Lévesque P., Bellenfant S., Berthod F.* (2013) *Tissue Eng Part.*, **9**, 55-64.
2. Неврология: национальное руководство / Под ред. акад. РАМН Гусева Е.И. (2009) ГЭОТАР-Медиа, М., 936 с.
3. *Фрешии Р.* (2010) *Культура животных клеток* (пер. с англ.), Бином, М., 691с.
4. *Уилсон К., Волкер Дж.* (2014) *Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии* (пер. с англ.), Бином, М., 848с.
5. *Brunelli A., Dimauro I., Sgrò P., Emerenziani G.P., Magi F., Baldari C., Guidetti L., Di Luigi L., Parisi P., Caporossi D.* (2012) *Med. Sci. Sports Exerc.*, **44**, 1771-1777.
6. *He Y.Y., Zhang X.Y., Yung W.H., Zhu J.N., Wang J.J.* (2013) *Mol. Neurobiol.*, **48**(3), 83-93.
7. *Huang E.J., Reichardt L.F.* (2001) *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 677-736.
8. *Siegel S.G., Patton B., English A.W.* (2000) *Exp. Neurol.*, **166**(2), 205-212.
9. *Sun X.L., Chen B.Y., Duan L., Xia Y., Luo Z.J., Wang J.J., Rao Z.R., Chen L.W.* (2014) *Mol. Neurobiol.*, **49**(1), 34-50.
10. *Пенниайнен В.А.* (2003) *Цитология*, **45**(4), 377-379.
11. *Черкасова Е.И., Брилкина А.А.* (2015) *Работа с культурами клеток*, из-во Нижегородского университета, Н.Н., 57 с.
12. *Martocchia A. et al.* (2014) *Aging Clin. Exp. Res.*, **26**(4), 4-16.
13. *Scassellati C., Zanardini R., Tiberti A., Pezzani M., Valenti V., Effedri P., Filippini E., Conte S., Ottolini A., Gennarelli M., Bocchio-Chiavetto L.* (2014) *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*, **23**(3), 7-23.
14. *Соколова М.Г., Лобзин С.В., Пенниайнен В.А., Лопатина Е.В., Резванцев М.В.* (2014) *Вестник СЗГМУ*, **6**(4), 45-52.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 19. 09. 2017.

THE ROLE OF POLYPEPTIDE COMPOUNDS IN MECHANISM OF CNS PLASTICITY IN PATIENTS WITH HEREDITARY PATHOLOGY OF PERIPHERAL MOTOR NEURON

M.G. Sokolova¹, S.V. Lobzin¹, V.A. Penniyaynen², A.V. Kipenko², E.V. Lopatina², M.V. Rezvantsev³, A.V. Gavrichenko¹

¹Mechnikov North-West State Medical University, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: sokolova.m08@mail.ru

²Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia

³Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

Synaptic pruning is a physiological mechanism of neuroplasticity, which is regulated through synthesis of growth polypeptides, neurotrophins. The role of neurotrophins in the mechanism of synaptic pruning in patients with hereditary pathology of peripheral motor neuron was studied in a clinical experimental trial. It was found that patients had elevated levels of regulatory growth polypeptides, which led to the axon growth inhibition effect in organotypic tissue cultures. Thus, neurotrophin overexpression can be considered as a factor preventing synaptic pruning and contributing to further process of neurological degeneration in nerve tissue in patients with hereditary pathology of peripheral motor neuron.

Key words: synaptic pruning, growth polypeptides, neurotrophins, brain derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), organotypic culture, blood serum, spinal muscle atrophy, hereditary motor sensory neuropathy