

# КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ

УДК 576.8.097.2+612.82+616.834

## ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

С.Г.МОРОЗОВ, И.А.ИВАНОВА-СМОЛЕНСКАЯ, Е.Д.МАРКОВА, М.А.ПИРАДОВ,  
В.В.ПОЛЕЩУК, Д.А.ЛАБУНСКИЙ, Б.Б.ГНЕДЕНКО

ГНЦ психиатрии и наркологии Минздравмедпрома РФ, НИИ неврологии РАМН  
107076, г.Москва, ул.Потешная, 3; факс 162 10 03

Образцы сыворотки 29 пациентов с болезнью Паркинсона были проанализированы на содержание аутоантител (а-АТ) и соответствующих антиидиотипических антител (АИАТ) к белкам мозга S-100, GFAP, НКР и МР-65. У больных с тяжелым течением болезни отмечалось повышение уровней а-АТ или АИАТ по крайней мере к трем из указанных белков. У больных с легким течением эти показатели были в основном в пределах нормы. После того, как ряду обследованных пациентов с тяжелым течением был проведен плазмаферез, у них наблюдалось уменьшение неврологического дефицита по шкале Webster с  $21 \pm 2$  до  $8 \pm 1$  баллов, а также снижение уровней а-АТ и АИАТ к указанным белкам до нормальных значений (в некоторых случаях они становились ниже нормы). Полученные данные свидетельствовали о наличии корреляции между степенью выраженности неврологического дефицита у пациентов с болезнью Паркинсона и уровнем/продукцией а-АТ и АИАТ к антителам нервной ткани.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, аутоантитела, антиидиотипические антитела, сыворотка.

**Введение.** Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что при болезни Паркинсона происходит активация синтеза аутоантител (а-АТ) к нейроантигенам. Показано, что сыворотка больных паркинсонизмом содержит а-АТ к антигенам (АГ) ствола, гипоталамуса, черной субстанции, к подкорковым образованиям [1, 2, 3]. Некоторые из этих а-АТ обнаружены и в спинно-мозговой жидкости [4]. Ряд работ посвящен изучению антител к нейромедиаторам при этом заболевании [5, 6]. Высказываются предположения, что аутоиммунный компонент имеет немалую значимость в патогенезе этого заболевания [3].

Повышенная проницаемость гемато-энцефалического барьера при болезни Паркинсона [7] может способствовать прохождению противомозговых а-АТ к своим мишеням, что, вероятно, сопровождается определенными нейрохимическими сдвигами.

Задача настоящего исследования состояла в определении сывороточных уровней а-АТ и соответствующих антиидиотипических антител (АИАТ) к белкам нервной ткани S-100, GFAP, НКР [8] и МР-65 [9] у пациентов с болезнью Паркинсона с тяжелым, средним и легким течением. У больных с тяжелым течением заболевания исследование сыворотки проводилось до и после плазмафереза.

Белки S-100 и GFAP часто используются в качестве маркеров клеток нервной ткани, а повышенные титры а-АТ к ним обнаружены в сыворотке крови при

целом ряде заболеваний нервной системы [10, 11]. НКП (нейроспецифический кислый протеин) был получен недавно [8]. Сравнение его физико-химических свойств со свойствами известных белков нервной ткани позволило сделать предположение, что он является неидентифицированным ранее АГ. НКП обладает выраженными иммуногенными свойствами — двукратная иммунизация им кроликов “шиншилла” позволяет получить преципитирующие сыворотки. Есть основания полагать, что а-АТ к нему могут быть хорошим маркером для оценки наличия и выраженности аутоиммунной агрессии к комплексу нейроантигенов при патологии нервной системы. Повышенные титры а-АТ к белку МР-65, описанному А.Б.Полетаевым [9], обнаружены при ряде заболеваний ЦНС (неопубликованные данные). Исходя из этого, мы сделали предположение, что по уровню а-АТ к указанным АГ при болезни Паркинсона возможно оценивать степень неспецифической аутоиммунной агрессии к комплексу нейроантигенов.

**Методика.** Белки S-100 и МР-65 получали по методикам, описанным А.Б.Полетаевым [12, 9]. Препарат GFAP был приготовлен по методу D.Dahl и A.Bignami [13], а препарат НКП по методике, описанной ранее [8].

В ходе работы было обследовано 29 пациентов с болезнью Паркинсона. Из них у 10 человек (5 мужчин, 5 женщин) наблюдалось тяжелое течение заболевания, у 10 человек (6 мужчин, 4 женщины) — средней тяжести, а у остальных 9 пациентов (4 мужчины, 5 женщин) — легкое течение. Возраст больных от 42 до 65 лет. Давность заболевания от 7 до 12 лет. Какая-либо другая патология у обследованных больных отсутствовала. Степень неврологического дефицита оценивали по шкале Webster [14]. Пяти больным с тяжелым течением заболевания был проведен плазмаферез (ПФ) с элиминацией до 2,0 л плазмы за 1 сеанс. Всего каждому больному проведено 3 сеанса центрифужного ПФ с интервалом в 2 дня. Элиминируемую плазму замещали соответствующим количеством коллоидов и кристаллоидов. На а-АТ к четырем вышеуказанным нейроантигенам протестированы образцы сыворотки 29 пациентов с болезнью Паркинсона, а также 87 образцов сыворотки здоровых доноров. Пациентам, которым проводили ПФ, иммунохимическое исследование на а-АТ и АИАТ к 4 белкам нервной ткани проводили трехкратно: до сеансов ПФ и спустя 1 и 3 недели после последнего. Образцы сыворотки больных и здоровых доноров подвергали однократной заморозке при  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Определение уровня а-АТ проводили с помощью стандартного твердофазного иммуноферментного анализа. Полистироловые планшеты фирмы Nunc (Дания) активировали растворами белков S-100, GFAP, НКП и МР-65 (2-3 мкг/мл) в 0,05 М карбонатном буфере pH 9,6 в количестве 100 мкл в лунку. Инкубацию проводили при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч. После отмывания планшета от несвязавшейся части АГ буфером (140 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8,7 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), содержащим 0,05% твина 20, его обрабатывали 0,05% раствором желатины в течение 1 ч при  $36^{\circ}\text{C}$ . После этого наносили образцы сыворотки больных и здоровых доноров, разведенные в 200 раз. После инкубации планшеты отмывали и наносили вторичные АТ — антивидовые IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Все разведения осуществляли на отмывающем буфере без детергента. Реакцию проявляли 0,001% раствором о-фенилендиамина (Диа-М, Россия) с 0,001% перекисью водорода на 0,2 М цитрат-фосфатном буфере pH 5,0). Спустя 10-15 мин. интенсивность реакции оценивали фотометрически на длине волны 492 нм.

Уровень АИАТ определяли аналогичным способом, только планшеты активировали Fab-фрагментами соответствующих антител [15]. Препараты антител к белкам S-100, GFAP, НКП и МР-65 получали иммуноаффинным способом из сывороток

иммунизированных кроликов породы "шиншилла". Используемые в работе тест-системы были охарактеризованы как высокоточные, надежные и воспроизводимые.

Ранее при тестировании более 500 образцов сыворотки крови клинически здоровых доноров на а-АТ и АИАТ к различным АГ было установлено, что границы их иммунореактивности находятся в пределах от -15% до +40% от их среднего значения (выражающегося в оптической плотности). Среднее значение оптической плотности, получаемое при тестировании образцов сыворотки здоровых доноров, в данной работе принималось за нулевое. Таким образом, в анализируемых пробах определяли содержание а-АТ и АИАТ к указанным выше нейроантигенам в процентах от среднего значения иммунореактивности сывороток здоровых лиц.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 1. При анализе полученных данных видно, что показатели а-АТ к белкам ткани мозга S-100, GFAP, НКП и МР-65, а также соответствующих АИАТ, в образцах сыворотки пациентов с болезнью Паркинсона с тяжелым течением заболевания (неврологический дефицит — 18-21 балл по шкале Webster) значительно отличаются от аналогичных показателей, полученных при обследовании пациентов с легким течением (неврологический дефицит менее 9 баллов). данные, полученные при обследовании пациентов с течением болезни средней тяжести (неврологический дефицит — 9-15 баллов) находятся как бы в промежутке между аналогичными показателями, полученными в результате обследования двух предыдущих групп больных.

Таблица 1.

Иммунореактивность сывороточных а-АТ и АИАТ к белкам ткани мозга S-100, GFAP, НКП и МР-65 у пациентов с болезнью Паркинсона

Группы обследуемых	N	Иммунореактивность а-АТ и АИАТ к белкам :															
		S-100				GFAP				НКП				МР-65			
		<	n	>	>>	<	n	>	>>	<	n	>	>>	<	n	>	>>
Тяжелое течение	10	0/0	1/1	7/6	2/3	0/0	7/3	3/7	0/0	0/0	2/0	5/7	3/3	0/0	1/0	5/4	4/6
Тяжелое течение (1 нед. после плазмафереза)	5	1/1	4/4	0/0	0/0	2/1	3/4	0/0	0/0	0/1	5/4	0/0	0/0	2/2	3/3	0/0	0/0
Тяжелое течение (3 нед. после плазмафереза)	5	0/1	5/4	0/0	0/0	1/1	4/4	0/0	0/0	0/1	5/4	0/0	0/0	1/2	4/3	0/0	0/0
Течение средней тяжести	10	0/0	4/3	5/6	1/1	2/2	7/6	1/2	0/0	0/1	5/4	5/5	0/0	1/1	4/5	3/2	2/2
Легкое течение	9	0/0	8/9	1/0	0/0	0/0	9/9	0/0	0/0	0/0	9/8	0/1	0/0	0/0	8/9	1/0	0/0

N — количество исследованных образцов сыворотки;

Иммунореактивность:

< — менее -15% от эталона;

n — в пределах от -15% до +40% от эталона (норма);

> — от 40 до 70% от эталона;

>> — выше 70% от эталона.

X/X — в числителе иммунореактивность а-АТ, в знаменателе — АИАТ.



Помимо определения а-АТ к ряду нейроантигенов, что достаточно часто проводится исследователями, в данной работе был изучен сывороточный уровень антиантител, или антиидиотипов. Это связано с тем, что данные молекулы, как известно, существенно влияют на иммунный ответ к различным АГ [16], и поэтому комплексное исследование иммунореактивности а-АТ и соответствующих АИАТ может дать, по нашему предположению, более целостное представление о наблюдаемых нарушениях гуморального иммунитета.

Наиболее значительные нарушения в системе гуморального иммунитета выявлены у пациентов с тяжелым течением болезни. У каждого такого больного отмечено повышение продукции/активности а-АТ или АИАТ по крайней мере к 3 из 4 указанным АГ. В целом, наблюдались достаточно однонаправленные изменения иммунореактивности а-АТ и соответствующих АИАТ. Возможно, наблюдаемое повышение уровня/активности АИАТ представляет собой как бы компенсаторную реакцию в ответ на повышения аналогичного показателя а-АТ, направленную на то, чтобы "вернуть" уровень а-АТ к исходному. Изменения уровня а-АТ к глиофибрилярному белку были наименее выражены.

Иммунореактивность а-АТ и АИАТ к используемым в работе АГ у больных с легким течением заболевания мало чем отличались от нормальных показателей. А у больных с течением болезни средней тяжести аномальные показатели иммунореактивности наблюдались примерно у половины пациентов. Причем у нескольких человек эти показатели были ниже нормы.

Мы полагаем, что наблюдаемые нарушения представляют собой неспецифическую реакцию организма в ответ на происходящие изменения в нервной ткани. Возможно, эти патологические процессы ведут к дисфункциям каких-то малоспецифических иммунорегуляторных механизмов, что может явиться причиной порочного круга.

Пяти пациентам с наиболее тяжелым течением заболевания, снижением чувствительности к ДОПА и холинолитическим препаратам, быстро прогрессирующей деменцией был проведен ПФ указанным выше способом. Через неделю после сеансов ПФ в неврологическом статусе этих больных отмечена достоверная ( $p < 0,05$ ) положительная динамика — уменьшение неврологического дефицита с  $20 \pm 2$  до  $8 \pm 1$  баллов по шкале Webster. Ятрогенные проявления лекарственной терапии стали менее выражены. Через 1 и через 3 недели после сеансов ПФ у них был произведен забор крови, и образцы сывороток были исследованы на содержание указанных выше а-АТ и АИАТ. Полученные показатели существенно отличались от тех, которые были получены перед ПФ. Так, ни у одного из этих пациентов уже не наблюдался повышенный уровень/активность исследуемых а-АТ и АИАТ. Напротив, у нескольких человек некоторые из данных показателей оказались ниже нормальных значений, что можно объяснить механическим удалением антител во время ПФ. Результаты, полученные через 3 недели после этой процедуры, не отличались значительно от результатов, полученных через 1 неделю после нее. И хотя, судя по данным, представленным в таблице, может создаваться впечатление, что иммунореактивность стала постепенно возрастать, на самом деле незначительные ее колебания наблюдались и в ту и в другую сторону, без какой-либо однонаправленной тенденции. При сопоставлении неврологического статуса больных между первой и третьей неделями после сеансов ПФ достоверных различий не найдено.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии корреляции между тяжестью течения болезни Паркинсона, или, точнее, степенью выражен-

ности нефрологического дефицита и уровнем/активностью а-АТ (и соответствующих АИАТ) к комплексу нейроантигенов.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кумарина Г.Л. Клиническое значение иммунобиохимических показателей в патогенезе и диагностике паркинсонизма. // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1988.
- 2 Dahlstrom A., Wigander A., Lundmark K. // J. Neural Transmis. — 1990. — Suppl. 29. — P. 195-206.
- 3 Langston J.W., Koller W.C., Giron L.T. // The Scientific Basis for the Treatment of Parkinson's disease / Ed. Olanow C.W. and Lieberman A.N.; Lances, New Jersey. — 1992. — P. 41-42.
- 4 Mcrae Degueurce A., Gottfries C.-G., Karlsson I., Svennerholm L., Dahlstrom A. // Acta physiol. scand. — 1986. — V. 126. — N 2. — P. 313-315.
- 5 Крыжановский Г.Н., Евсеев В.А., Магаева С.В. // Бюл. exper. биол. — 1991. — N 11. — С. 470-472.
- 6 Крыжановский Г.Н., Маньковский Н.Б., Карабань И.Н., Магаева С.В., Трекова Н.А., Ветрилэ Л.А., Башарова Л.А., Атаджанов М.А., Голубев К.М. // Журн. невропатол. и психиатр. — 1994. — N 5. — С. 21-26.
- 7 Sandyk R., Iacono R.P., Bamford C.R. // Ital. J. Neurol. Sci. — 1987. — V. 8. — N 3. — P. 227-234.
- 8 Панченко Л.Ф., Врублевский А.Г., Брюн Е.А., Морозов С.Г., Абрамова О.С. // Вопросы наркологии. — 1994. — N 3. — С. 41-44.
- 9 Полетаев А.Б., Вабищевич Н.К., Пятигорская С.Р. // Способ скринингового обследования женщин детородного возраста с помощью тест-системы ELI-P для прогноза развития эмбриона-плода и рождения здорового либо аномального ребенка. — Патент N 95105847/14(010520).
- 10 Jankovic B.D., Djordjijevic D. // Int. J. Neurosci. — 1991. — V. 60. — P. 119-127.
- 11 Mecocci P., Parnetti L., Donato R., Santucci C., Santucci A., Cadini D., Foa E., Cecchetti R., Senin U. // Brain Behav. Immun. — 1992. — V. 6. — P. 286-292.
- 12 Полетаев А.Б. Мозгоспецифические белки группы S-100, их эндогенные акцепторы и лиганды, и регуляция метаболических процессов в нервной ткани. // Дис. докт. мед. наук. — М.: НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина АМН СССР. — 1987. — С. 43-48.
- 13 Dahl D., Bignami A. // Biochim. biophys. Acta. — 1975. — V. 386. — P. 41.
- 14 Webster D.D. // Mod. Treat. — 1968. — N 5. — P. 257-282.
- 15 Demignot S., Garnett M.C., Baldwin R.W. // J. Immunol. Meth. — 1989. — V. 121. — N 2. — P. 209-217.
- 16 Роум А. Основы иммунологии. — М., 1991. — С. 142-145.

## SOME IMMUNOCHEMICAL CORRELATES OF THE COURSE SEVERITY OF THE PARKINSON'S DISEASE

S.G.Morozov, I.A.Ivanova-Smolenskaya, E.D. Markova, V.V.Poleshuk, D.A.Labinsky,  
B.B.Gnedenko

The serum samples from 29 patients with Parkinson's disease were analysed for the levels of the autoantibodies (a-AB) and antiidiotypic antibodies (AIAB) to the proteins of nervous system S-100, GFAP, NKP and MP-65. High levels of a-AB or AIAB to at least 3 proteins were seen in patients with severe course of the disease. No significant changes of these levels were observed in patients with light course of the disease. The plasmapheresis was carried out to some patients with severe course of the disease. After this procedure the decrease of neurological deficit from number  $21 \pm 2$  to  $8 \pm 1$  on Webster's scale and decrease of a-AB and AIAB levels to normal values (in some cases it became lower than normal values) were observed. It can be concluded that the levels of the a-AB to the nervous tissue proteins correlate with clinical condition of the patient.

<sup>38</sup> **Key words:** Parkinson's disease, autoantibodies, antiidiotypic antibodies, serum.