

УДК 616.832+612.547:547.466.3

©Коллектив авторов

ОСНОВНОЙ БЕЛОК МИЕЛИНА. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ, РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В. П. ЧЕХОНИН, О.И. ГУРИНА, Т.Б. ДМИТРИЕВА, А.В. СЕМЕНОВА,
Е.А. САВЧЕНКО, М.Э. ГРИГОРЬЕВ

Лаборатория иммунохимии Государственного научного центра социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского, г. Москва.

В обзоре рассмотрены физико-химические свойства, биологическая роль основного белка миелина – одного из белков, входящих в состав миелиновой оболочки. Приведены литературные данные, касающиеся процессов фосфорилирования, метилирования, ацилирования ОБМ в организме человека и животных. Продемонстрированы процессы взаимодействия с липидами. С использованием иммуногистохимических методов исследования, *Northern* анализа показан синтез ОБМ в онтогенезе. Большое внимание уделено анализу клинко-диагностической значимости ОБМ, а также перспективам применения его в качестве одного из критериев контроля течения рассеянного склероза, маркера нарушения процессов миелинизации при опухолях головного мозга, при гидроцефалии и другой неврологической патологии.

Ключевые слова: основной белок миелина, онтогенез, рассеянный склероз, гидроцефалия, опухоли головного мозга, демиелинизирующие заболевания.

ВВЕДЕНИЕ. Молекулярная организация миелина. Основная информация о структуре миелина получена с помощью рентгено-структурного анализа и электронной микроскопии [1–10]. Уникальной морфологической особенностью миелина является то, что он формируется в результате спирального обвития отростков олигодендроглиоцитов в центральной нервной системе и шванновских клеток на периферии, вокруг аксонов нейронов [2, 7, 10–13]. Таким образом, миелин представляет собой своеобразную мембрану, состоящую из липидного бислоя и белков, связанных с ним. В образовании миелиновой оболочки и структуре миелина ЦНС и периферической нервной системы (ПНС) имеются отличия. При формировании миелина ЦНС один олигодендроглиоцит имеет связи с несколькими сегментами миелина нескольких аксонов; при этом к аксону примыкает отросток олигодендроглиоцита, расположенного на некотором расстоянии от аксона, а внешняя поверхность миелина соприкасается с внеклеточным пространством. Шванновская клетка при образовании миелина

ПНС формирует спиральные пластинки миелина и отвечает лишь за отдельный участок миелиновой оболочки между перехватами Ранвье. Цитоплазма шванновской клетки вытесняется из пространства между спиральными витками и остается только на внутренней и наружной поверхностях миелиновой оболочки [2, 12].

Среди белков миелина выделяют так называемые внутренние (*intrinsic*) и внешние (*extrinsic*) белки [14]. Первые прочно связаны с мембраной, проходя сквозь нее, в то время как другие, расположенные поверхностно, связаны слабее. Подобная мембрана является асимметричной по химическому составу и электрическому заряду. Ее экстрацеллюлярная поверхность богата углеводными остатками гликопротеинов и гликолипидов, при этом С-конец гликопротеинов находится на цитоплазматической стороне мембраны, тогда как полисахаридный остаток экспонирован на экстрацеллюлярной поверхности. Расстояние между разнонаправленными гидрофильными группировками липидов в мембране миелина составляет 4,5-5,0 нм, в то время как расстояние между соседними витками спирали - 3,0-5,0 нм. Толщина мультислойного образования, сформированного исключительно липидами, составляет 1,5-3,0 нм [2, 14-16].

Процесс формирования миелина отростками глиальных клеток сопровождается вытеснением цитоплазмы таким образом, что цитоплазматические поверхности мембраны плотно соприкасаются друг с другом, образуя так называемую главную плотную линию (*major dense line*). Плотный контакт наружных поверхностей мембран, образующихся при спиралевидном обвитии отростков миелинообразующих клеток вокруг аксонов нейронов, способствует формированию, так называемой межпериодической линии (*interperiod line*) [2, 12] (рис.).

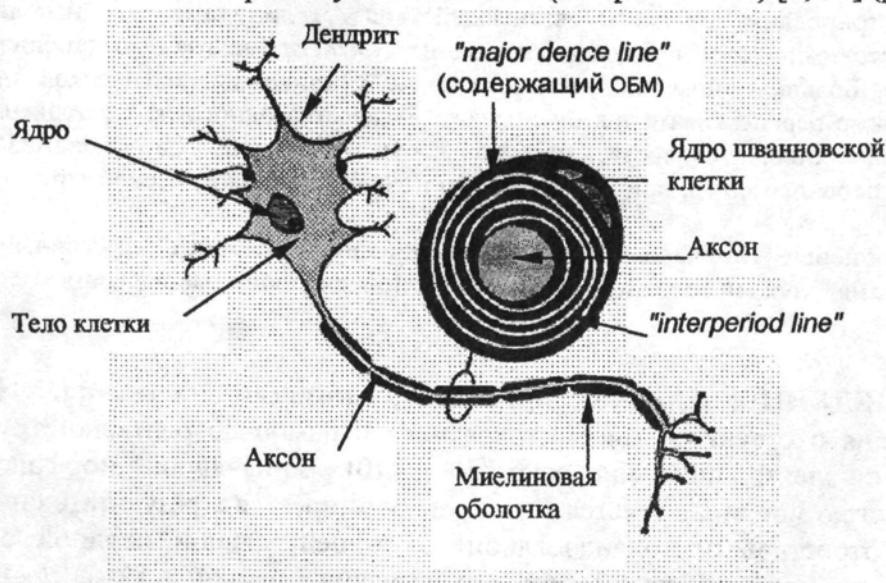


Рисунок.

Строение миелина периферической нервной системы

Одной из биохимических характеристик, которая отличает миелин от других биологических мембран, является высокое соотношение липид/белок. Белки составляют от 25 до 30 % массы сухого вещества миелиновой оболочки. На долю липидов приходится приблизительно 70-75 % от сухой массы белого вещества ЦНС млекопитающих; в миелине спинного мозга соотношение липиды:белки выше [12, 15]. Из общего количества липидов на долю холестерина

приходится около 28 %, 43 % – на фосфолипиды и 29 % составляют галактолипиды. Известно, что липиды оказывают существенное влияние на конформационные характеристики белков, входящих в состав мембраны миелина; последние в свою очередь влияют на свойства липидов [2, 12].

Основной функцией миелина является быстрое проведение нервного импульса по аксонам, которые он окружает. Мембраны клеток, формирующих миелин, плотно соприкасаются, что обеспечивает высокое сопротивление и малую емкость, обеспечивая, таким образом, аксону эффективную изоляцию и предотвращая продольное распространение импульса. Миелин прерывается только в области перехватов Ранвье, которые встречаются через правильные промежутки длиной примерно 1 мм. В связи с тем, что ионные токи не могут проходить сквозь миелин, вход и выход ионов осуществляется лишь в области перехватов. Это ведет к увеличению скорости проведения нервного импульса. Таким образом, по миелинизированным волокнам импульс проводится приблизительно в 5-10 раз быстрее, чем по немиелинизированным [2, 12].

Помимо передачи нервного импульса, миелин участвует в питании нервного волокна, а также выполняет структурную и защитную функции.

Основной белок миелина.

Строение, физико-химические свойства. При электрофоретическом анализе в ПААГ с SDS экстрактов миелиновой оболочки человека [1, 17, 18] определяется до 10 полос. Основную полосу (около 50% всех белков), составлял протеолипидный белок (PLP) с молекулярной массой 30 кДа.

Вторыми в количественном соотношении (около 30%) были белки, входящие в так называемую группу **основных белков миелина (ОБМ)**, соответствующие молекулярным массам от 17 до 21,5 кДа. Данную группу составили 3 изоформы ОБМ с молекулярными массами 21,5 кДа, 18,5 кДа и 17,5 кДа. Первая из них кодируется 7 экзонами; в результате делеции 2 экзонов синтезируется белок молекулярной массой 18,5 кДа. При кодировании же изоформы массой 17,5 кДа были подвержены делеции 5 экзонов [18–21]. Показано, что ген ОБМ человека расположен на 18 хромосоме и имеет 3 промоторные области, с которых начинается считывание информации [21].

У различных видов животных было также показано наличие нескольких изоформ данного белка [23, 24]. Так, ОБМ крысы включает в себя 4 изоформы с молекулярными массами 21,5, 18,5, 17,0 и 14,0 кДа. Интересно, что изоформы ОБМ массами 21,5 и 18,5 кДа кодируются экзонами, комплементарными человеческим, за небольшим исключением, касающимся незначительных перестановок последовательностей. В изоформе ОБМ с массой 17,0 кДа делеции подвержен 6 экзон. Делеция 2 и 6 экзонов наблюдается при кодировании изоформы белка массой 14,0 кДа. Эти две изоформы ОБМ крысы, таким образом, не имеют человеческих аналогов. Кроме того, доказано наличие изоформ ОБМ с молекулярными массами 21,5, 17,0 и 14,0 кДа в ткани ЦНС мыши [25]. Низкомолекулярные изоформы белка образуются путем делеции участка хромосомы, кодирующей аминокислотные последовательности в области С-конца. Недавние исследования [26] показали наличие ОБМ с молекулярной массой 21,5 кДа в мозге барана, при этом было доказано, что он не является предшественником низкомолекулярных изоформ белка. Кроме того, ОБМ с молекулярной массой 13,5 кДа был идентифицирован в мозге серебряного караса [27].

В настоящий момент полностью установлена аминокислотная последовательность [17, 26, 28, 29] 18,5 кДа изоформы ОБМ человека [30], морской свинки [31], свиньи [32]. Проводятся исследования по определению аминокислотной последовательности ОБМ кролика, быка, обезьяны [33].

Интересен тот факт, что человеческий ОБМ имеет вариации последовательностей аминокислот в 46 и 47 положении. Здесь может находиться глицин, как самостоятельно, так и в сочетании с серином [30]. Согласно более ранним исследованиям, у больных с рассеянным склерозом отмечалась замена серина на глицин в 44-49 положениях [34].

Показано, что среди млекопитающих имеется значительная степень гомологии между аминокислотными последовательностями ОБМ [35, 36].

Рядом авторов была показана высокая степень гомологии – порядка 80-90% [29, 35, 36] аминокислотной последовательности ОБМ у различных видов животных. Так, аминокислотные последовательности ОБМ человека и быка имеют различия аминокислотных остатков лишь в нескольких положениях, в то время как ОБМ крысы отличаются от ОБМ человека и быка положением 40 аминокислотных остатков в середине полипептидной цепи (от 118 до 157 остатка).

ОБМ содержит необычайно высокий процент (приблизительно 25 %) основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), равномерно распределенных по всей полипептидной цепи, что и обуславливает очень высокую изoeлектрическую точку ОБМ ($pI=12-13$) [37, 38]. Основная изоформа ОБМ с молекулярной массой 18,5 кДа в дальнейшем может быть субфракционирована в щелочной среде по зарядам. Подобная неоднородность заряда увеличивается в результате фосфорилирования и дезаминирования *in vivo*. В процессе дальнейшего выделения белка происходит дополнительное дезаминирование и деградация в области С-конца. Такая гетерогенность зарядов может варьировать у различных индивидуумов в зависимости от возраста и патологического состояния организма [39].

Фосфорилирование ОБМ. Процесс фосфорилирования является основным источником гетерогенности. Процесс фосфорилирования ОБМ в оптическом нерве крысы возрастает в процессе развития [40]. Фосфорилирование может способствовать приобретению молекулой белка гидрофильных свойств и уменьшать величину положительного заряда. Таким образом, фосфорилированная форма ОБМ должна в наименьшей степени взаимодействовать с анионными фосфолипидами. Это отражается в снижении способности фосфорилированных форм белка к индукции агрегации пузырьков [41]. Кроме этого, и способы модификации, обуславливающие изменения его заряда, влияют на данную способность, а также изменяют организацию липидного слоя [42].

Наличие в миелине протеинкиназной и фосфолипазной активности объясняют способностью регулировать чрезмерное фосфорилирование ОБМ. Протеинкиназа миелина, выделенного из мозга человека, способна активироваться как кальцием или cAMP [43], так и фосфатидилинозитол-4-фосфатом [44]. Наличие высоких концентраций фосфатидилинозитолкиназы отмечается в миелине, выделенном из головного мозга быка [45]. Данный фермент может быть вовлечен в регуляцию механизма контроля чрезмерного фосфорилирования белка. Остатки белка, подвергающиеся фосфорилированию в условиях *in vitro*, зависят от вида протеинкиназы [46]. Протеинкиназа С важна в

качестве регулятора клеточного числа. ОБМ является благоприятным субстратом для действия данного фермента [47]. Некоторые участки этого белка являются специфическими ингибиторами активности протеинкиназы С. Так, было продемонстрировано, что деградация миелина может возрастать при ослаблении регуляторного контроля, обеспечиваемого данным ферментом. Миелиногенез осуществляется при адгезии олигодендроцита к субстрату. Этот процесс сопутствует активации фосфорилирования ОБМ протеинкиназой С [48]. Кроме того, процесс фосфорилирования ОБМ также регулируют ганглиозиды [49]. Фосфорилирование, катализируемое протеинкиназой С, стимулируется ганглиозидами; в то время, как фосфорилирование других участков белка, катализируемое сАМР-зависимой протеинкиназой, ими тормозится. Ганглиозиды подавляют также активацию протеинкиназы С диацилглицеролом. Участки молекулы ОБМ, подвергающиеся фосфорилированию *in vitro*, были выявлены методом высокоэффективной хроматографии высокого давления. Фосфорилирование *in vivo* происходит по-разному у различных видов млекопитающих, так, у быка, оно осуществляется в 97 и 165 положениях; у кролика – в 7, 56, 96, 113, 163 положениях. Кроме того, было выявлено, что в развивающемся мозге мыши, процессы фосфорилирования начинаются на самых ранних стадиях [50], что подтверждает предположение о непосредственном их участии в механизмах миелинизации.

Метилирование ОБМ. Другое преобразование белка, происходящее посттранскрипционно, заключается в метилировании одиночного аргининового остатка в 107 положении. Процесс катализируется специфическим ферментом аргинин-метилтрансферазой. Экспрессия данного фермента регулируется тиреоидными гормонами [51].

Степень метилирования ОБМ значительно варьирует в процессе развития. На исключительную важность метилирования ОБМ указывает тот факт, что инициация демиелинизации возможна при ингибировании биосинтеза S-аденозил-L-метионина циклолейцином, а формирование компактной структуры миелина подавляется синефунгином – ингибитором метилтрансферазы. S-аденозил-L-метионин является донором метильных групп для аргининового остатка ОБМ [51]. У мышей линии *jimpy*, характеризующихся гипомиелинизацией, отмечается более низкий, по сравнению с нормальными, уровень ОБМ-специфичной аргинин-N-метилтрансферазы. Процесс миелинизации не может быть успешно завершен при нормальном уровне синтеза ОБМ потому, что метилирование белка не протекает в достаточной степени и становится невозможным его интеграция в миелиновую мембрану. Недавние исследования показали, что у этих мышей страдает и уровень синтеза ОБМ, а также полностью отсутствует синтез PLP. Отсутствие последнего может критически влиять на способность ОБМ внедряться в миелиновую мембрану [52].

У другой линии мутантных мышей *shiverer*, нарушение процесса миелинизации происходит в результате иных механизмов [53]. Мыши *shiverer* являются мутантными аутосомными рецессивными мышами, с дефицитом содержания миелина в ЦНС. Данная мутация заключается в делеции 20 т.п.о. гена, которая приводит к отсутствию ОБМ [21, 54]. Гомозиготные мыши являются отличной поведенческой моделью, у которых наблюдается около 12 дня постнатального развития дрожание, конвульсии и ранняя смерть. Морфологический анализ показал практически полное отсутствие миелина в

ткани мозга со слабо миелинизированными аксонами. Миелин у этих мышей был аномальным, представлял собой неплотную оболочку, что косвенным образом свидетельствовало о том, что ОБМ необходим для формирования плотности оболочки [55]. Напротив, миелин ПНС у мышей *shiverer* был качественно и количественно нормальным, с нормальной толщиной и структурой, относительно небольшие аномалии миелина наблюдались на рентгенограммах седалищного нерва у взрослых мышей *shiverer* [56]. Биохимические изучения миелина у мышей *shiverer* показали некоторые изменения в количестве липидов. Однако, отсутствие у таких мышей ОБМ не нарушает формирование компактного миелина в ПНС, которое, возможно, компенсирует другой белок миелина – P₀ [57].

Известно, что все изоформы ОБМ могут подвергаться ацетилированию N-конца. Однако и свободный C-конец способен подвергаться действию карбоксипептидаз. ОБМ подвержен действию различных протеолитических ферментов. Гидролиз белка под действием катепсина D ускоряется в присутствии кислых липидов. Этот процесс может быть ограничен как ферментативно, так и неферментативно при деградации ОБМ в процессе изоляции. Этот метод основан на хроматографическом удалении примесей протеолитических ферментов и исключении неферментативной деградации при высоких значениях pH и температур [58].

Показано, что минорные фракции ОБМ содержат ковалентно связанный в области серинового остатка в 54 положении фосфатидилинозитолбисфосфат. В процессе экспериментального аллергического энцефаломиелита степень связывания фосфатидилинозитолбисфосфата сначала снижается, а затем возрастает [59].

Изучение структурной организации молекулы ОБМ в растворе проводилось с помощью ЯМР-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии, калориметрии, а также с применением иммунологических методов анализа [60–62].

В растворе ОБМ имеет тенденцию к самоассоциации, которая играет важную роль в поддержании компактной структуры миелина. Белок в растворе представлен смесью мономер-гексамерных форм с преобладанием цепей с β -структурой [63]. Преобладание β -структуры и формирование α -структуры индуцируется в фрагментах ОБМ при переносе из водной фазы в трифторэтанол [64].

Взаимодействие ОБМ с липидами. ОБМ как мембранный компонент, имеет значительное сродство к липидам, с которыми в комплексе и выделяется [8, 65]. Кроме того, будучи поликатионом, ОБМ формирует наиболее стабильные комплексы с анионными липидами [2, 66]. Но, несмотря на то, что степень связывания ОБМ значительно выше с кислыми липидами, она достаточно выражена и в отношении цвиттер-ионов, особенно – со сфингомиелином. ОБМ также взаимодействует с фосфатидилэтаноламином при pH 7,2, где этот липид находится преимущественно в цвиттер-форме. Удивительна способность ОБМ формировать нерастворимые комплексы с SDS как выше, так и ниже изоэлектрической точки [67].

При формировании комплексов ОБМ с основной массой анионных фосфолипидов, играют роль в равной степени как гидрофобные, так и электростатические взаимодействия [68]. Наиболее выраженное влияние на

стабилизацию липидов ОБМ оказывает при интеграции в липидные хвосты [69,70].

ОБМ также способствует освобождению глюкозы из многослойных липосом, содержащих G_{M4} ганглиозид, который является специфическим маркером миелина и олигодендроглии в ЦНС [71].

Как было показано методом рентгеноструктурного анализа, при формировании миелина происходит погружение большей части ОБМ в слой липидных головок. Известно, что ОБМ ускоряет формирование мультислоя фосфатидилглицерола [72] и индуцирует формирование многослойной мембранной структуры с двойной периодичностью бислоя. Холестерол может увеличивать связывание протеина с поверхностью бислоя, открывая каналы между диацил-липидными головками [73].

Smith предположил, [74] а работы Yohg [75] и Cheifetz [41] подтвердили, что ОБМ является стимулятором везикулярной агрегации, которая служит моделью молекулярных взаимодействий, имеющих важное значение для формирования компактной структуры миелина и его стабилизации в мультислойной структуре мембраны. ОБМ способен индуцировать агрегацию пузырьков, содержащих только фосфатидилхолин, однако степень агрегации значительно усиливается кислыми фосфолипидами. Агрегация фосфолипидных пузырьков под влиянием ОБМ значительно усиливается в присутствии алифатических альдегидов [2]. Высказываются предположения, что возрастание уровня алифатических альдегидов может быть связано с демиелинизирующими заболеваниями [76]. Холестерол увеличивает способность ОБМ к стимуляции агрегации пузырьков фосфатидилсерина [77].

Brady et. al. [72], а также Sridhara et. al. [78] показали некоторые различия в свойствах ОБМ, выделенного из нормального миелина и ОБМ, выделенного из ткани мозга больных рассеянным склерозом (РС). ОБМ нормального миелина более активен в отношении индукции формирования многослойной структуры с фосфатидилглицеролом [72] и инициации агрегации везикул фосфатидилхолина [78]. Независимо от источника выделения ОБМ (нормальный миелин или миелин при РС), было показано, что компоненты белка, имеющие одинаковый заряд, в равной степени способны индуцировать формирование липидного мультислоя. Также было показано, что отличия ОБМ из нормального миелина и из миелина при РС, вызваны различием зарядов изомеров, входящих в состав ОБМ [66].

ОБМ в филогенезе и онтогенезе. Как филогенетически, так и онтогенетически, появление ОБМ может быть связано с дифференцировкой олигодендроглиоцитов и шванновских клеток. В процессе эволюции нервной системы позвоночных дифференцировка глии на клетки двух типов совпадает с появлением миелинизированных волокон, а также с ограничением способности к функциональной регенерации.

Сравнительные исследования ОБМ из ткани мозга различных биологических видов животных показали значительное межвидовое сходство. ОБМ выделен и очищен, а также описаны его свойства из ткани мозга человека, быка, крысы, мыши, морской свинки [1, 26, 29, 30, 32].

Обнаружение филогенетического сходства гликопротеинов у различных биологических видов дало основание провести исследование этого белка в процессе онтогенеза. Так, Grever и et. al. [11] проводили с помощью иммуногистохимического и *Northern blott* анализа количественное определение

ОБМ в ткани спинного мозга плодов человека с 12 до 24 недели гестации. Развитие структуры миелина исследовали с помощью электронной микроскопии. Тридцать восемь образцов спинного мозга плодов были получены после прерывания внематочной беременности. В период между 12 и 18 неделями гестации показано 15,8-кратное увеличение синтеза ОБМ мРНК. С 18 по 24 недели гестации синтез ОБМ мРНК увеличился в 2,2 раза. Параллельно проведенный иммуноблот-анализ показал 90,5-кратное увеличение ОБМ¹ (от 0,147 нг/мг до 13,3 нг/мг) между 12 и 18 неделями гестационного развития и приблизительно 11,5-кратное увеличение между 18 и 24 неделями гестации (с 13,3 до 154 нг/мг ткани). Иммуноцитохимический анализ также показал повышение степени окрашивания на ОБМ с увеличением гестационного возраста. У плода с гестационным возрастом 12 недель ОБМ определялся во всех трех боковых канатиках спинного мозга, с 18 недель гестационного развития ОБМ экспрессировался во всем белом веществе мозга, за исключением боковых кортикоспинальных путей и ростральных уровней *fasciculus gracilis*. Авторы также исследовали структуру миелина с помощью электронной микроскопии. В 12 недель гестации миелиновая оболочка представляла собой редкую неуплотненную пластину, в 18 недель гестации наблюдались отдельные точки компактного миелина, которые экспрессировали ОБМ, в 24 недели гестации компактный миелин наблюдался во всем белом веществе спинного мозга. Таким образом, авторами было продемонстрировано количественное увеличение экспрессии ОБМ, связанное с формированием миелина в течение второго триместра беременности.

Weidenheim и соавт. [79, 80] с помощью иммуногистохимического анализа определяли ОБМ в ткани спинного мозга (в цервикальном, грудном и люмбосакральном уровнях) и стволовой части головного мозга эмбрионов человека на протяжении первого и второго триместров беременности. С 9-10 недель гестации ОБМ-позитивные олигодендроглиоциты наблюдались по периферии эпиндимы. В переднем и боковом канатиках экспрессия ОБМ олигодендроглиоцитами отмечалась с 10-12 недель гестационного развития. В заднем канатике ОБМ детектировался на более поздних сроках гестационного развития, чем в антилатеральном белом веществе. ОБМ с 10 недели гестации обнаруживался в основном по срединной линии ствола мозга и экспрессировался латеральнее на протяжении второго триместра беременности. Таким образом, авторы заключили, что ОБМ присутствует с 10 недель гестации антилатерально в цервикальной области спинного мозга и срединной линии стволовой области мозга и экспрессируется в рострально-хвостовом направлении от антилатеральной к задней области. Исключением, однако, является область *fasciculus gracilis*, которая имела большее количество ОБМ-положительных клеток на поясничном уровне, чем в более ростральных областях.

Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [13,81,82].

Таким образом, приведенные выше факты свидетельствуют об общем явлении эмбриогенеза человека: начало синтеза нейроспецифических антигенов приходится на 10-18 недели гестации.

Клинико-диагностическое значение ОБМ

Применение ОБМ в качестве маркера деструкции миелина открыло новое направление в нейробиологии, посвященное исследованию значимости этого антигена в диагностике демиелинизирующих заболеваний [24, 29, 83–97].

Основная часть этих работ посвящена анализу ОБМ в спинномозговой жидкости (СМЖ) больных рассеянным склерозом [86, 94, 95, 98]. В частности, в работе Thompson и соавт. [94] приводятся результаты определения ОБМ с помощью конкурентного радиоиммунного анализа в пробах СМЖ 221 пациента с рассеянным склерозом. В качестве группы сравнения были выбраны пациенты с различной неврологической патологией (85 человек). При этом повышение концентрации ОБМ было выявлено у 46 из 55 пациентов (84%) с рецидивом рассеянного склероза на протяжении 6 недель и только у 11 из 84 пациентов (13%) с другими неврологическими заболеваниями. При этом имела четкая корреляция между уровнем ОБМ в СМЖ и тяжестью рецидива ($P < 0,01$). Из 44 пациентов, находящихся в стадии ремиссии, у 12 были выявлены повышенные концентрации ОБМ в СМЖ и эти пациенты имели высокую степень вероятности повторения рецидива заболевания ($P < 0,05$). У 72 пациентов с прогрессирующим процессом присутствие ОБМ в СМЖ достоверно отражало клинический диагноз. К подобному заключению пришли Ohta и *et. al.* [24], которые методом иммуноферментного анализа (ИФА) исследовали образцы СМЖ у больных рассеянным склерозом в различных стадиях и больных с другими неврологическими заболеваниями. В результате исследования было выявлено, что у 78 пациентов в острой фазе рассеянного склероза отмечались повышенные концентрации ОБМ в СМЖ. Полученные данные коррелировали с таковыми, полученными при исследовании методом радиоиммунного анализа, но предел чувствительности ИФА был ниже и составлял 30 нг/л. Аналогичные результаты приведены в работах [91, 98, 100], что дает основание рекомендовать применение анализа ОБМ в СМЖ как маркера в диагностике рассеянного склероза и служить прогностическим критерием активности патологического процесса. Необходимо отметить ряд исследований, связанных с изучением концентрации ОБМ в СМЖ пациентов различного возраста [97, 101, 102]. Так, van Engelen *et. al.* [102] проводили количественный анализ ОБМ, а также NSE и S-100 у детей (от периода новорожденности) и взрослых (до 91 года) в норме и при неврологической патологии. Нормативные концентрации ОБМ в СМЖ и сыворотке крови у людей среднего возраста составляли 4,0 и 1,4 нг/мл, соответственно [97, 101, 102]. Авторы отметили также пропорциональное увеличение концентрации нейроспецифических белков в онтогенезе с интенсивностью около 1% в каждый последующий год жизни.

Кроме диагностики рассеянного склероза, ряд работ посвящен сравнительному исследованию ОБМ при целом ряде других заболеваний, сопровождающихся процессом демиелинизации. Так, Lamers *et. al.* методом РИА изучали концентрации ОБМ (наряду с исследованием концентраций NSE и S-100) в СМЖ детей и взрослых с различной неврологической патологией: у больных с рассеянным склерозом (хронически-прогрессивным, рецидивирующе-ремиттирующим и комбинацией обоих типов), при цереброваскулярных нарушениях (с ишемическим и геморрагическим инсультами), у пациентов с деменцией (сосудистой и Альцгеймеровского типа) и при инфекциях ЦНС [87]. Достоверно более высокие уровни ОБМ наблюдались в группе больных с

рассеянным склерозом; также достоверное повышение уровней ОБМ отмечалось при цереброваскулярных инсультах и в группах детей с эцефалопатиями.

Несомненно, заслуживают внимания работы, посвященные количественному анализу ОБМ при гидроцефалии. Так, Longatti et. al. [89] исследовали уровень ОБМ у детей первого года жизни, страдающих постгеморрагической гидроцефалией. Авторами было показано значительное увеличение концентраций этого белка в динамике гидроцефалии. Ранее этими же авторами был продемонстрирован феномен более чем 20-кратного увеличения концентрации ОБМ в образцах СМЖ больных с гидроцефалией, полученных при вентрикулярной пункции по сравнению с люмбальной. В то же время, после проведения операции шунтирования отмечалось значительное снижение уровня ОБМ в СМЖ при вентрикулярной пункции. В результате проведенных исследований, авторы делают вывод о том, что анализ ОБМ в СМЖ при гидроцефалии может служить маркером активности развития гидроцефалии, и рекомендуют применение иммунохимического мониторинга ОБМ в динамике и при прогнозировании постгеморрагических гидроцефалий, а также в качестве одного из основополагающих критериев для проведения операции шунтирования. Результаты этой работы нашли экспериментальное подтверждение в исследованиях Del Bigio et. al. [103], которые выдвинули гипотезу о том, что прогрессирующая гидроцефалия может вызывать задержку процессов миелинизации. Исследователи вызывали гидроцефалию у 3-дневных крысят путем введения каолина в *большую цистерну*. В результате этой работы было показано, что гидроцефалия способна вызвать задержку процесса миелинизации. В то же время, своевременная операция шунтирования может активировать комплекс процессов компенсаторной миелинизации, однако, в случае длительной экспозиции гидроцефалии, процессы восстановления белого вещества весьма проблематичны.

Интересными, на наш взгляд, являются работы посвященные исследованию концентраций ОБМ в СМЖ [92, 104] и в сыворотке крови [105] больных с опухолями головного мозга. Так, Nakagawa et. al. [106] провели количественное определение ОБМ методом РИА у пациентов с различными видами глиальных опухолей, включая злокачественные. Высокие концентрации ОБМ (выше 4 нг/мл) авторы выявили у пациентов с диссеминацией злокачественных опухолей в мозговую оболочку. В случаях позитивной реакции организма пациентов на химио- или рентгенотерапию (что подтверждалось с помощью КТ, ЯМР, при общем и цитологическом исследовании СМЖ, а также клиническом обследовании), обнаруживалось достоверное снижение концентрации ОБМ в биологических жидкостях, а некоторых случаях даже до уровня нормы. В СМЖ шести пациентов со злокачественными глиомами без метастазирования концентрация ОБМ была значительно выше нормы до начала химиотерапии, а во время лечения наблюдалось дальнейшее повышение уровня ОБМ, однако после окончания химиотерапии концентрация ОБМ снизилась до уровня нормы. У некоторых пациентов со злокачественными глиомами, сопровождающимися метастазированием, авторы отмечали снижение концентраций ОБМ до 4 нг/мл после комплекса проведенных операций по удалению опухолей и химиотерапии (или облучения) в случаях благоприятного клинического течения. Таким образом, был сделан вывод о перспективности

применения количественного мониторинга ОБМ для диагностики и прогнозирования течения опухолевых процессов, обусловленных глиомами.

Серия исследований Yamazaki et. al. [97] была посвящена количественному динамическому анализу ОБМ и NSE в сыворотке крови больных с острыми травмами головного мозга. У пациентов в остром периоде после черепно-мозговой травмы уровни ОБМ в сыворотке крови динамично возрастали с 1,4 нг/мл до 11,3 нг/мл и были достоверно ниже, чем у пациентов с прогностически неблагоприятным исходом (смерть пациентов). Авторы исследования пришли к выводу, что концентрация ОБМ в сыворотке крови коррелирует со степенью повреждения ткани мозга и определение уровня этого белка, наряду с определением NSE, может служить достоверным лабораторным маркером объема и степени повреждения ткани мозга при острых черепно-мозговых травмах. Аналогичное заключение было сделано ранее и Noseworthy et. al. [107], которые проводили исследования концентрации ОБМ в сыворотке крови у пациентов в динамике спустя 7 дней, 3 и 6 месяцев после острой черепно-мозговой травмы.

Интересным является цикл работ, посвященных изучению диагностической роли анти-ОБМ-антител в сыворотке крови и СМЖ пациентов с различными неврологическими заболеваниями. При этом, хотя и наибольшее количество исследований посвящено диагностике рассеянного склероза [84, 92, 93, 95, 108–116], вряд ли есть основания сделать однозначный вывод о каких-либо перспективах применения анти-ОБМ-антител в диагностике этого заболевания.

Так, группа исследователей под руководством K.G. Warren проводила радиоиммунный анализ анти-ОБМ-антител в СМЖ [95, 99, 111, 114, 116] больных с рассеянным склерозом и другими неврологическими заболеваниями. Авторы выделили два вида антител к ОБМ: «свободные» и «связанные» антитела. При остром рецидиве рассеянного склероза, соотношение концентраций «свободных» и «связанных» антител был выше единицы, в то время, как у пациентов с хроническим вариантом заболевания это соотношение было ниже единицы. По мере наступления ремиссии у пациентов с острым рецидивом, коэффициент постепенно уменьшался и в конечном итоге, антитела на пределе чувствительности метода не обнаруживались. У пациентов с хроническим течением рассеянного склероза выведение антител происходило более медленно и в СМЖ низкие значения антител определялись более длительное время. Кроме изучения динамики элиминации антител в образцах сыворотки крови и СМЖ больных с рассеянным склерозом, авторы выявили анти-ОБМ-антитела в образцах СМЖ больных с острым идиопатическим невритом (преимущественно «свободные» антитела), что дало им основание предположить наличие аутоиммунного компонента в патогенезе острого идиопатического неврита.

Но в тоже время, Brokstad et. al. [85] не выявили анти-ОБМ-антител при иммунохимическом исследовании сыворотки крови и СМЖ пациентов с рассеянным склерозом, а также другими неврологическими заболеваниями.

Приведенные данные, достаточно информативно показывают ценность ОБМ как иммунохимического маркера олигодендроглиоцитов и шванновских клеток при фундаментальных и клинических исследованиях, а также необходимость разработки тест-систем определения данного белка и анти-ОБМ-антител в СМЖ и сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beniac D.R., Wood D.D., Palaniyar N. (2000) J Struct Biol., **129** (1). 80-95;
2. Epand R.M. (1988) In: Neuronal and glial proteins: structure, function and clinical application., 231-265;
3. Facci P., Cavatorta P., Cristofolini L. (2000) Biophys J., **78** (3), 1413-1419;
4. Holton T., Ioerger T.R., Christopher J.A. (2000) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **56** (Pt 6), 722-734;
5. Kleywegt G.J. (1999) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **55** (11), 1878-1884;
6. Kirschner D.A., Ganser A.L., Caspar D.L. (1984). In: Myelin (P. Morell, ed.), 2nd Ed., Plenum: New York, pp. 51-95
7. Pritzker L.B., Joshi S., Harauz G. (2000) Biochemistry, **39** (18), 5382-5388;
8. Riccio P., Fasano A., Borenshtein N. (2000), J. Neurosci. Res., **15**, № 59 (4), 513-521;
9. Raine C.S. (1984) In: Myelin (P. Morell, ed.), 2nd Edn., Plenum: New York, pp. 1-50
10. Balendiran G.K., Schmutgen F., Scapin G. (2000), J. Biol. Chem., **275**, 27045-2754;
11. Grever W.E., Chiu F.C., Tricoche M. (1996), J. Comp. Neurol., **376** (2), 306-314;
12. Garbay B., Heape A.M., Sargueil F. et al. (2000), Progr. Neurobiol., **61**, 267-304;
13. Grever W.E., Weidenheim K.M., Tricoche M. (1997), J Neurosci Res, **47**, 332-340;
14. Braun P.E. (1984) In: Myelin (P. Morell, ed.), 2nd Ed., Plenum: New York, 97-113
15. Cuzner M.L., Norton W.T. (1996), Brain Pathol, **6** (3), 231-242;
16. Kirschner D.A., Blaurock A.E. (1991) In: Myelin. Biology and chemistry. (R.E. Martenson, ed.), CRC Press: Boca Raton, Florida, pp. 413 - 448
17. Norton W.T., Cammer W. (1984) Isolation and characterization of myelin. In: Myelin (Ed. Morell P.) Plenum Press, N-Y, pp.147-195;
18. Shults C.W., Whitaker J.N., Wood J.G. (1978), J. Neurochem., **30**, 1543-1551;
19. Campagnoni A.T., Pribyl T.M., Campagnoni C.W. et al. (1993), J. Biol. Chem., **268**, 4930 - 4938.
20. Kamholz J., De Ferra F., Puckett C. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 4962 - 4966.
21. Devine-Beach K., Lashgari M.S., Khalili K. (1990), J Biol Chem, **265**, 13830-1385;
22. Roach A., Takahashi N., Pravtcheva D. et al (1985), Cell, **42**, 149-155;
23. Jacque C., Delassalle A, Raoul M (1983), J Neurochem, **41** (5), 1335-1340;
24. Ohta M., Ohta K., Ma J. (2000), Clin Chem, **46** (9), 1326-1330;
25. Barbarese E., Braun P.E., Carson J.H. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3360-3364.
26. Carnegie P.R. (1971), Nature (London), **229**, 25 - 28;
27. Roots B.I., Agrawal D., Weir G. et al. (1984), J. Neurochem., **43**, 1421-1424;
28. Белик Я.В. (1980), От химической топографии мозга к нейроспецифическим белкам и их функциям. Биохимия животных и человека: Биохимия белков нервной системы, с. 11-22.
29. Терлецкая Я.Т., Белик Я.В., Козулина Е.П. и др. (1987), Молекулярная биология, N 21, 15-26;

30. Gibson B.W., Gilliom R.D., Whitaker J.N. (1984), *J. Biol. Chem.*, **259** (8), 5028-5031.
31. Deibler G.E., Martenson R.E., Krutzsch H.C. *et al* (1984), *J. Neurochem.*, **43**, 100-105.
32. Kira G., Deibler G., Krutzsch H.C. *et al.* (1985), *J. Neurochem.*, **44**, 134-142;
33. Deibler G.E., Krutzsch H.C. and Martenson R.E. (1985), *J. Biol. Chem.*, **260** (1), 472-474;
34. Chou C.-H., Chou F. C.-H., Kowalski T.J. *et al.* (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 745 - 750;
35. Day E.D. (1981) *Contemp. Top. Mol. Immunol.*, **8**, 1-39.
36. Day E.D., Hashim G.A., Varitek V.A. *et al* (1981), *J. Neuroimmunol.*, **1** (3), 311-324.
37. Chevalier D., Allen B.G. (2000), *Protein Exp. Purif.*, **18** (2), 229-234;
38. Wong R.W. (1999), *Mol. Biotechnol.*, **13** (1), 17-19.
39. Riederer B., Honegger C.G., Tobler H.J. *et al* (1984) *Gerontology*, **30**, 234-239;
40. Murray N., Steck A.J. (1984), *J. Neurochem.*, **43**, 243-248.
41. Cheifetz S., Moscarello M.A. (1985) *Biochemistry*, **24**, 1909-1914.
42. Brady G.W., Fein D.B., Wood D.D. *et al* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 1161-1165.
43. Wu N.C., Ahmad F. (1984) *Biochem. J.*, **218**, 923-932.
44. Deshmukh D.S., Kuizon S., Brockerhoff H. (1984), *Life Sci.*, **34**, 259-264.
45. Saltiel A.R., Fox J.A., Sherline P. (1987), *Biochem. J.*, **214**, 759-763.
46. Kishimoto A., Nishiyama K., Nakanishi H. *et al* (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12492-12499.
47. Wise B.C., Glass D.B., Chou C.H. *et al* (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 8489-8495.
48. Vartanian T., Szuchet S., Dawson G. *et al* (1986), *Science*, **234**, 1395-1398.
49. Chan K.-F. J. (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 2415-2422.
50. Ulmer J.B., Braun P.E. (1986), *Develop. Biol.*, **117**, 502-510.
51. Amur S.G., Shanker G., Pieringer R.A. (1984) *J. Neurochem.*, **43**, 494-498.
52. Sorg B., Agrawal D., Agrawal H. *et al* (1986) *J. Neurochem.*, **46**, 379-387.
53. Kim S., Tuck M., Kim M. (1986) *J. Neurosci. Res.*, **16**, 357-365.
54. Molineaux S.M., Engh H., De Ferra F. *et al* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7542-7546.
55. Shine H.D., Readhead C., Popko B. (1992) *J. Neurochem.* **58** (1), 342-349.
56. Kirschner D.A., Ganser A.L. (1980) *Nature*, **283**, 207-210.
57. Martini R., Zielasek J., Toyka K. *et al* (1995) *Nature Genet.*, **11**, 281-286.
58. Williams K.R., Williams N.D., Konigsberg W. *et al.* (1986) *J. Neurosci. Res.*, **15**, 137-145.
59. Chiu K.C., Westall F., Smith R.A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 426-432.
60. Deibler G.E., Burlin T.V., Stone A.L. (1995) *J. Neurosci. Res.*, **15**, 819-827.
61. Fraser P.E., Deber C.M. (1985) *Biochemistry*, №13, 4593-4598;
62. Kobayashi N., Freund S.M., Chatellier J. *et al* (1999) *J. Mol. Biol.*, **292** (1), 181-190;
63. Smith R. (1985) *FEBS Lett*, **183**, 331-334;
64. Martenson R.E., Mendz G.L., Moore W.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 1269-1276.

65. Riccio V., Tsugita A., Bobba A. et al (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 484-492.
66. Moscarello M.A., Chia L.S., Leighton D. et al (1985) *J. Neurochem.* **45** (2), 415-421.
67. Moskaitis J.E., Campagnoni A.T. (1986) *Neurochem. Res.*, **11**, 299-315.
68. Boggs J.M., Moscarello M.A. (1984) *Can J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**, 11-18.
69. Boggs J.M., Moscarello M.A., Papahadjopoulos D. (1982) In: *Lipids and protein interactions* (Eds. P.Jost and O.H. Griffith), vol. **2**, pp.27-51;
70. Boggs J.M., Rangaraj G., Koshy K.M. (1999) *J. Neurosci. Res.*, **57**, 529-535;
71. Mullin B.R., Decandis F.X., Montanaro A.J. et al (1981) *Brain Res.*, **222**, 218-221.
72. Brady G.W., Murthy N.S., Fein D.B. et al (1981) *Biophys. J.*, **34**, 345-350.
73. Sedzik J., Blaurock A.E., Hoechli M. (1984) *J. Mol. Biol.*, **174**, 385-409.
74. Smith R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 170-184.
75. Yohg P.R., Vacante D.A., Synder W.R. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7287-7291.
76. Fu S.C., Mozzi R., Krakowka S. et al (1980), *Acta Neuropathol. (Berl)*, **49** (1), 13-18.
77. Walker A.G., Rumsby M.G. (1985) *Neurochem. Int.*, **7**, 441-447.
78. Sridhara S., Epand R.M., Moscarello M.A. (1984) *Neurochem. Res.*, **9**, 241-248.
79. Weidenheim K.M., Epshteyn I., Rashbaum W.K. (1993) *J. Neurocytol.*, **22** (7), 507-516
80. Weidenheim K.M., Bodhireddy S.R., Rashbaum W.K. (1996) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **55** (6), 734-745.
81. Bodhireddy S.R., Lyman W.D., Rashbaum W.K. (1994) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **53** (2), 144-149.
82. Zecevic N., Andjelkovic A., Matthieu J. (1998) *Brain Res. Dev. Brain. Res.*, **14**, 97-108.
83. Хохлов А.П., Савченко Ю.Н. (1990) Миелинопатии и демиелинизирующие заболевания, Медицина.
84. Annunziata P., Pluchino S., Martino T. (1997) *J. Neuroimmunol.*, **77** 128-133.
85. Brokstad K.A., Page M., Nyland H. (1994) *Acta Neurol. Scand.*, **89** (6), 407-411.
86. Fesenmeier J.T., Whitaker J.N., Herman P.K. (1991) *J. Neuroimmunol.*, **34** (1), 77-80.
87. Lamers K.J., van Engelen B.G., Gabreels F.J. (1995) *Acta. Neurol. Scand.*, **92** (3), 247-251.
88. Lamers K.J., de Reus H.P., Jongen P.J. (1998) *Mult. Scler.*, **4** (3), 124-126.
89. Longatti P.L., Guida F., Agostini S. (1994) *Childs Nerv. Syst.*, **10** (2), 96-98.
90. Maatta J.A., Coffey E.T., Hermonen J.A. et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238** (2), 498-502.
91. Massaro A.R., Michetti F., Laudisio A. (1985) *Ital. J. Neurol. Sci.*, **6** (1), 53-56.
92. Melse J., Noppe M., Crols R. (1983) *Acta Neurol. Belg.*, **83** (1), 17-22.
93. Soderstrom M., Link H., Xu Z. (1993) *Neurology*, **43** (6), 1215-1222.
94. Thompson A.J., Brazil J., Feighery C. (1985) *Acta Neurol. Scand.*, **72** (6), 577-583.
95. Wood D.D., Bilbao J.M., O'Connors P. (1996) *Ann Neurol.*, **40** (1), 18-24.
96. Warren K., Catz I. Johnson E. (1994) *Ann Neurol.*, **35** (3), 280-289.
97. Yamazaki Y., Yada K., Morii S. et al (1995) *Surg. Neurol.*, **43** (3), 267-270.
98. Barkhof F., Frequin S.T., Hommes O.R. (1992) *Neurology*, **42** (1), 63-67.

99. Warren K.G., Catz I. (1993) *J. Neurol Sci*, **115** (2), 169-176.
100. Sellebjerg F., Christiansen M., Nielsen P.M. (1998) *Mult. Scler.*, **4** (6), 475-479.
101. Garcia-Alix A., Cabanas F., Pellicer A. (1994) *Pediatrics*, **93** (2), 234-240.
102. van Engelen B.G., Lamers K.J., Gabreels F.J. (1992) *Clin. Chem.*, **38** (6), 813-816.
103. Del Bigio M.R., Kanfer J.N., Zhang Y.W. (1997) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56** (9), 1053-1066.
104. Matias-Guiu J., Martinez-Vazquez J., Ruibal A. (1986) *Acta Neurol. Scand.*, **73** (5), 461-465.
105. Seeldrayers P.A., Hoyle N.R., Thomas D.G. (1984) *J. Neurooncol.*, **2** (2), 141-145.
106. Nakagawa H., Yamada M., Kanayama T. (1994) *Neurosurgery*, **34** (5), 825-833.
107. Noseworthy T.W., Anderson B.J., Noseworthy A.F. (1985) *Crit. Care Med.*, **13** (9), 743-746.
108. Sellebjerg F., Christiansen M., Garred P. (1998) *Mult Scler*, **4** (3), 127-131.
109. Кучинскене Д.И. (1992), Клиническое значение определения антител к основному белку миелина у больных рассеянным склерозом, ретробульбарным невритом и здоровых родственников., Автореф. дисс... канд. мед. наук.
110. Sellebjerg F., Frederiksen J.L., Olsson T. (1994) *Scand. J. Immunol.*, **39** (6), 575-580.
111. Бойко А.Н., Фаворова О.О. (1995) *Мол. биол.*, **29**, № 4, 727-749.
112. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. (1997) *Рассеянный склероз.*, с. 463.
113. Warren K.G., Catz I. (1993) *J. Neuroimmunol.*, **43** (1-2), 87-96.
114. Warren K.G., Catz I. (1994) *J. Neurol Sci*, **121** (1), 66-73.
115. Warren K.G., Catz I. (1995) *J. Neurol Sci*, **133** (1-2), 85-94.
116. Warren K.G., Catz I. (1999) *Eur. Neurol.*, **42** (2), 95-104.

Поступила 13.11.00.

MYELIN BASIC PROTEIN. STRUCTURE, PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES, BIOLOGICAL FUNCTION AND DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE FOR THE DEMYELINATING DISEASES

V.P.CHEKHONIN, O.I.GURINA, T.B.DMITRIEVA, A.V. SEMENOVA,
E.A.SAVCHENKO, M.E.GRIGOR'EV.

Serbsky National Research Centre for Social & Forensic Psychiatry,
23 Kropotkinsky Per., Moscow, Russia.

Physico-chemical properties and biological role of myelin basic protein (MBP) - one of the main myelin membrane proteins are reviewed. The data on MBP phosphorylation, methylation, fatty acid acylation and on interaction with lipid molecules in the human and animals bodies are presented. Much attention has been paid to the discussion of the diagnostic and clinical significance of the MBP, as the marker of demyelinating process in the central and peripheral nervous system.

Key words: myelin basic protein, ontogenesis, multiple sclerosis, hydrocephalus, brain tumor, demyelination diseases.