

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

УДК 577.152.6
©Коллектив авторов

СОДЕРЖАНИЕ МЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

Т.В. Витрещак, В.В. Полещук, М.А. Пирадов

Институт неврологии РАМН, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80
тел.: (095)490-24-09; факс (095)-490-2408; эл.почта: vitreshak@list.ru

В крови двух групп пациентов с болезнью Паркинсона (БП), различающихся по глубине неврологической симптоматики и активностям моноаминоксидазы В (МАО В) и Cu/Zn-супероксиддисмутазы (СОД), исследовано содержание нейромедиаторных аминокислот до и после лечения He-Ne-лазером. Показано, что у пациентов с умеренной неврологической симптоматикой, находящихся на ранних стадиях заболевания и характеризующихся пониженной активностью МАО В и СОД, наблюдается повышенное содержание таурина и глутамата, причем между этими параметрами обнаруживается положительная корреляция. У пациентов с тяжелой неврологической симптоматикой и повышенными активностями МАО В и СОД обнаруживается пониженный уровень таурина и отсутствует корреляция между таурином и глутаматом. Эта корреляция восстанавливается после лазеротерапии, снижающей тяжесть неврологической симптоматики, что позволяет считать таурин маркером компенсаторных резервов организма.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, нейромедиаторные аминокислоты, таурин, глутамат

ВВЕДЕНИЕ. В основе функциональной организации нервной системы лежит взаимодействие между двумя основными проявлениями нервной деятельности - возбуждением и торможением. Нарушение баланса этих двух процессов сопровождается развитием многих патологических состояний. Содержание в крови нейромедиаторных аминокислот, среди которых имеются как медиаторы возбуждения (глутамат, аспартат и их амиды аспарагин и глутамин), так и медиаторы, вызывающие стабилизацию потенциала постсинаптической мембраны и тем самым оказывающие тормозной эффект (глицин, таурин), представляет интерес для исследования, как показатель этого баланса в норме и его нарушений у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями.

Еще в 1971 г. было показано, что глутамат и его аналоги способны вызывать нейротоксические повреждения в мозге [1]. Позднее были получены данные, иллюстрирующие, что нарушения метаболизма глутамата и аспартата могут приводить к нейродегенеративным процессам [2,3]. Обнаружено, что глутамат, аспартат и их амиды вызывают в мозге животных биохимические и морфологические изменения, подобные наблюдаемым у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [2,3].

Одним из распространенных нейродегенеративных заболеваний, в основе которого лежат нарушения обмена медиаторов, является болезнь Паркинсона (БП). Основным морфологическим субстратом заболевания является дофаминергическая система черной субстанции мозга (*substantia nigra pars compacta*) [4], в которой глутамат и аспартат играют роль возбуждающих нейромедиаторов. Нарушение их метаболизма при БП является одной из причин окислительного стресса, развитие которого выражается как в дисбалансе между проокислительными и антиокислительными системами организма, так и в изменении содержания возбуждающих и тормозных нейромедиаторных аминокислот в мозге и, возможно, в других тканях организма [2,4].

Ранее нами была исследована активность тромбоцитарной моноаминоксидазы В (МАО В), участвующей в метаболизме дофамина, и играющей проокислительную роль при развитии БП, а также эритроцитарной Cu/Zn-супероксиддисмутазы (СОД) - важнейшего фермента клеточной антиокислительной защиты. Было обнаружено, что пациенты с БП разделяются на две группы: с достоверно пониженными (группа I) и повышенными (группа II) активностями МАО В и СОД относительно группы контроля. Средняя длительность болезни у пациентов I группы была менее 5 лет ($3,8 \pm 1,2$ года), у пациентов II группы - свыше 5 лет ($7,1 \pm 1,5$ года). При этом пациенты первой группы характеризовались в среднем менее выраженной стадией заболевания, более молодым возрастом, меньшей длительностью болезни и лечения ДОФА-препаратами [5,6]. Корреляции между активностями этих ферментов и тяжестью заболевания позволяли заключить, что существуют параметры периферической крови, которые могут служить показателем глубины заболевания и использоваться в качестве биохимического (прогностического) теста.

В настоящей работе представлены результаты исследования некоторых возбуждающих и тормозных медиаторных аминокислот (аспаргата, глутамата, аспарагина, глутамина, глицина, таурина) у больных БП и проведено сопоставление этих данных с результатами лазеротерапии, применяемой при лечении БП в качестве дополнительной терапии к медикаментозным способам лечения [6, 7].

МЕТОДИКА. В работе приведены результаты обследования 70 больных БП (36 женщин и 34 мужчины, средний возраст 62 ± 6 года), кровь которых использовалась в биохимических исследованиях. Средняя длительность заболевания составляла 5,8 лет (менее 2 лет болело 9 пациентов, 2-5 лет - 34 пациента, и 6-15 лет - 27 пациентов), а средняя тяжесть заболевания составляла 65 ± 6 балла по шкале Фана-Элтона (UPDRS). Больные находились на лечении препаратами L-ДОФА: до 1 года - 30 пациентов, и 1,5-15 лет - 40 пациентов. Селегилин или другие ингибиторы МАО В при лечении не использовались. Контрольную группу представили 26 практически здоровых доноров, средний возраст которых составлял 49 ± 6 лет. Различия возрастных характеристик между исследуемыми группами были статистически не значимыми.

Исследование содержания в крови пациентов нейромедиаторных аминокислот и неврологической симптоматики проводили до и на третий день после окончания курса лазеротерапии (5 сеансов по 20 мин ежедневно), осуществляемой с использованием He-Ne оптического генератора АЛОК-1 с длиной волны 632,8 нм [6].

Кровь собирали из локтевой вены пациентов утром натощак в пластиковую пробирку с гепарином (37 ед гепарина на 1 мл крови), центрифугировали 1 мин при 500 g, пипеткой снимали 100 мкл верхнего слоя плазмы, помещали в пластиковую пробирку с 400 мкл метанола для осаждения белков и вновь центрифугировали в том же режиме. Полученный супернатант использовали для определения содержания аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентной детекцией. В работе использован хроматограф ALTEX 110А с колонкой "Ultrasphere-I.P.ODS" ($d_p = 5 \mu$, 4,6x250 мм; Beckman). Подвижная фаза представляла собой 0,1 М ацетат натрия (рН 5,8),

смешанный с метиловым спиртом таким образом, чтобы в конечном растворе его концентрация составляла 30%; скорость потока составляла 1 мл/мин. Измерения проводили при $\lambda_{\text{ex}} = 340$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 470$ нм. Расчет количества аминокислот осуществляли на интеграторе "Waters 740".

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы "EXCEL", определяя с помощью корреляционного анализа достоверность различий средних значений параметров у разных групп пациентов. Достоверность корреляций оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различие средних показателей считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Содержание исследованных нейромедиаторных аминокислот в крови здоровых доноров соответствовало литературным данным [8].

Учитывая описанную ранее гетерогенность популяции обследуемых пациентов как по неврологическим, так и по биохимическим признакам [5, 6], мы провели анализ содержания нейромедиаторных аминокислот отдельно для двух описанных нами групп (с пониженной и повышенной активностью MAO B и Cu/Zn-СОД соответственно).

При анализе содержания в крови аминокислот обнаружилось, что уровень глутамата, аспарагина и таурина достоверно повышен лишь у пациентов I группы, а у пациентов II группы он находился на уровне контроля. В то же время, у пациентов второй группы было достоверно повышено содержание глицина и глутамина; содержание аспартата в крови пациентов обеих групп достоверно не отличалось от нормы (рис. 1, табл.).

После курса лазеротерапии у пациентов I группы наблюдалось снижение содержания всех исследуемых соединений, проявляющееся в той или иной степени. В результате, уровень глутамата и аспарагина перестал достоверно отличаться от нормы, уровень таурина, хотя и несколько понизился ($p < 0,1$), но продолжал отличаться от нормы, а уровень глицина и аспартата, несколько повышенный до лечения, после лазеротерапии оказался в пределах нормы (рис. 1, табл.).

Во II группе, включающей пациентов с более тяжелой формой заболевания, лазеротерапия вызвала разнонаправленные изменения измеряемых параметров. В то время, как уровень аспартата и аспарагина оставался в прежних пределах (равных норме), содержание глутамата, не отличавшееся от нормы до лечения, немного возрастало; уровень таурина повышался примерно в 1,7 раза относительно нормальных значений, а содержание глутамина и глицина, бывшее повышенным

Таблица. Активность MAO B тромбоцитов, Cu/Zn-СОД эритроцитов, а также содержание в крови таурина и глутамата у пациентов с БП и здоровых доноров в сопоставлении с неврологическими показателями

Исследуемые группы		Таурин, мкмоль/л	Глутамат, мкмоль/л	MAO B, нмоль/мг белка в час	Cu/Zn-СОД, ед/мг Hb	Тяжесть болезни, баллы	Длительность ДОФА-терапии, годы	Общее количество принятых ДОФА-препаратов, кг	Длительность болезни, годы
Группа I	До лечения	67±6	46±4	47±5 **	0,78±0,04 **	55±4 ***	1,4±0,3	0,140±0,80	3,9±1,2
	После лечения	102±9 * **	56±5 **	71±6 *	0,94±0,05 *	45±3			
Группа II	До лечения	90±8 **	62±5 **	120±10 **	1,34±0,06 **	73±5	3,2±0,5 ***	0,575±0,12 ***	7,1±1,5 ***
	После лечения	75±7	53±4	95±7 * **	1,11±0,04 *	59±3			
Доноры		60±6	44±4	73±7	1,07±0,05	---	---	---	---

Примечания: В таблице приведены средние значения ± ошибка средней. * $p < 0,05$ - достоверность различий параметров у больных до и после лечения; ** $p < 0,05$ - достоверность различий параметров у больных и у группы контроля; *** : $p < 0,05$ - достоверность различий параметров у больных I и II групп. Результаты исследования MAO B и Cu/Zn-СОД взяты из нашей предшествующей публикации [6] для сопоставления.

МЕДИАТОРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКЕНСОНА

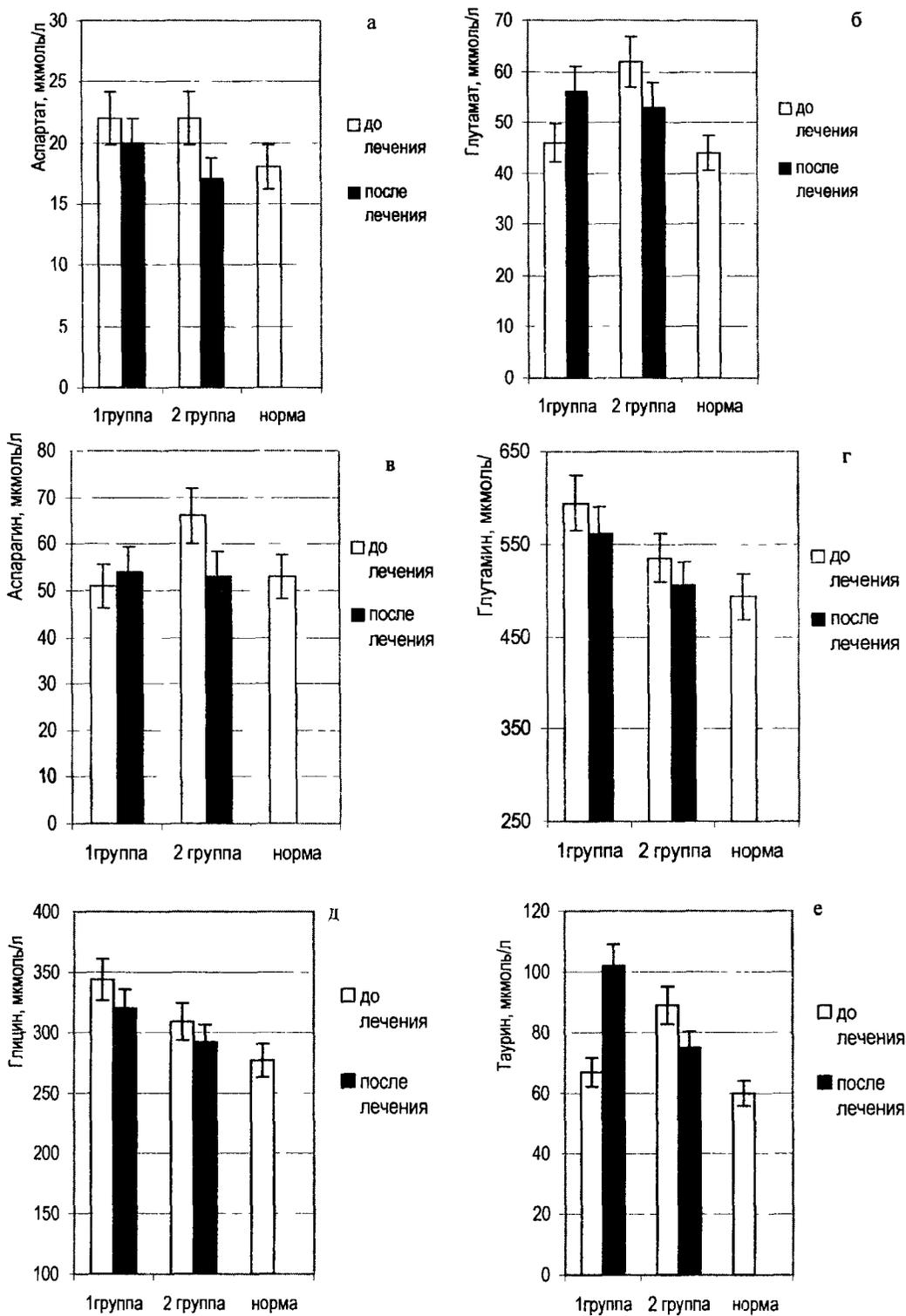


Рисунок 1.

Средний уровень аспартата (а), глутамата (б) аспарагина (в), глутамина (г), глицина (д) и таурина (е) в плазме крови пациентов с БП до и после лазеротерапии и у здоровых доноров. По оси ординат - концентрация соответствующих соединений, $\mu\text{mol/L}$.

перед лечением, понижалось, приближаясь к норме (табл.). Поскольку лазеротерапия, судя по ослаблению неврологических показателей, приводила к уменьшению состояния пациентов (табл.), можно было заключить, что обнаруженные изменения в содержании нейромедиаторных аминокислот в крови отражают аналогичные процессы в тех отделах мозга, которые вовлечены в развитие БП.

Для выявления взаимосвязи между исследованными параметрами мы провели корреляционный анализ полученных результатов. При этом у всех обследованных пациентов отмечена достоверная отрицательная корреляция ($r = -0,41$, $p < 0,05$) между уровнем в крови таурина и общим количеством принятых пациентом ДОФА-препаратов (рис. 2 а). Другими словами, у тех больных, которые почти не принимали L-ДОФА, уровень таурина был выше и сильнее отличался от нормы, чем у пациентов, которые получали ДОФА-терапию в течение длительного времени. При этом лазеротерапия приводила к повышению уровня таурина в крови пациентов II группы, получающих ДОФА-терапию длительное время.

У всех пациентов нами была обнаружена достоверная отрицательная корреляция между уровнем таурина и активностью Cu/Zn-СОД ($r = -0,43$, $p < 0,05$) (рис. 2 б). Эта корреляция проявлялась примерно одинаково для обеих групп пациентов: I группа - $r = -0,5$, II группа - $r = -0,44$. После лазеротерапии эта зависимость переставала выявляться.

При отдельном анализе данных по группам пациентов была также обнаружена положительная корреляция между содержанием глутамата и таурина у пациентов I группы как до ($r = 0,6$, $p < 0,05$), так и после лечения ($r = 0,56$, $p < 0,05$) (рис. 3 а и б). У пациентов II группы эта корреляция не проявлялась до, но становилась явной после лечения ($r = 0,65$, $p < 0,05$) (рис. 3 в и г). Между уровнем таурина и аспарагина выявлялись более слабые положительные корреляции - в I группе пациентов $r = 0,4$ как до, так и после лечения, во II группе $r = 0,2$ до лечения и $r = 0,4$ после лечения. В норме как для глутамата и таурина, так и для таурина и аспарагина $r = 0,6$ ($p < 0,05$).

Статистически значимые различия в уровне таурина между первой и второй группами пациентов позволяет предположить, что увеличение содержания таурина на ранних стадиях развития БП отражает компенсаторный ответ

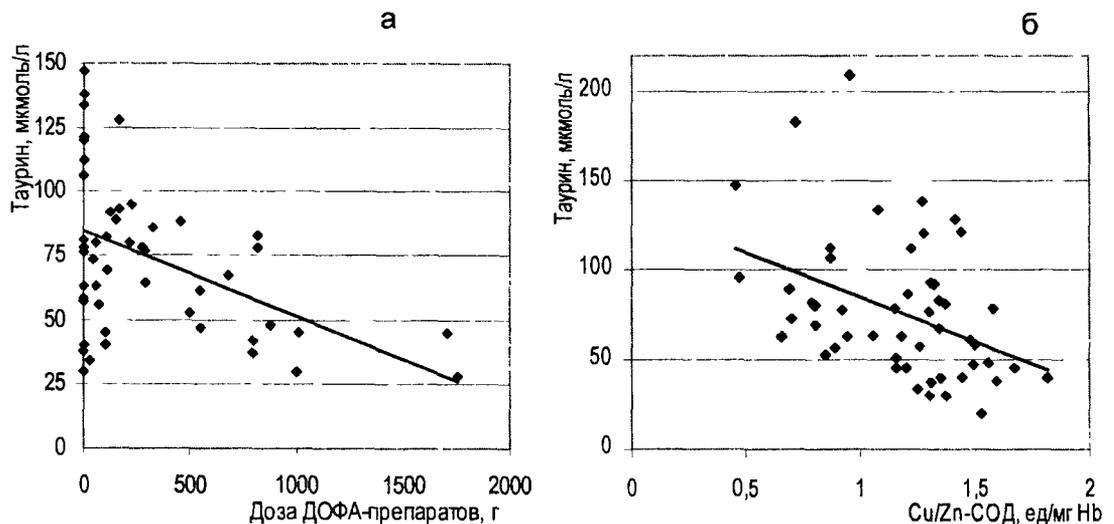


Рисунок 2.

(а) Корреляционные взаимосвязи между количеством таурина в плазме крови пациентов с БП и суммарным количеством ДОФА-препаратов, принятых пациентом за время лечения. По оси ординат - концентрация таурина, мкмоль/л; по оси абсцисс - суммарное количество принятых ДОФА-препаратов, г. (б) Корреляционные связи между количеством таурина в плазме крови и активностью СОД у обследованных пациентов в целом. По оси ординат - концентрация таурина, мкмоль/л; по оси абсцисс - активность СОД, ед/мг Нб.

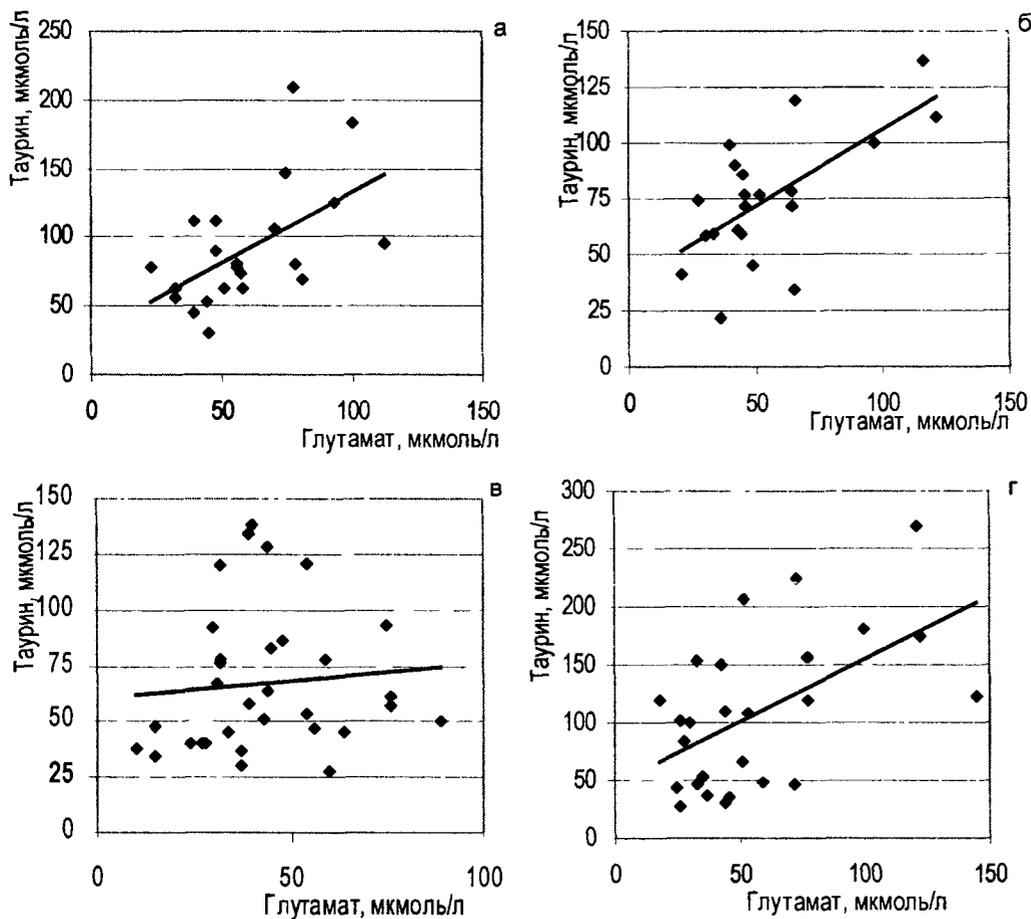


Рис. 3.

Корреляционные связи между количеством глутамата и таурина в плазме крови пациентов с БП до и после лазеротерапии. а - корреляция между количеством глутамата и таурина в плазме крови пациентов I группы до лазеротерапии; б - то же после лазеротерапии; в - корреляция между количеством глутамата и таурина в плазме крови пациентов II группы до лазеротерапии, г - то же после лазеротерапии. По оси ординат - концентрация таурина (мкмоль/л), по оси абсцисс - концентрация глутамата (мкмоль/л).

организма на тяжесть поражения. Корреляционный анализ показывает, что повышение уровня таурина сопровождается и высоким содержанием глутамата. Хотя прямой взаимосвязи между обменом в организме глутамата и таурина не выявлено, однако известно, что в качестве тормозной аминокислоты таурин участвует в регуляции Са-зависимых клеточных реакций, активирующихся в результате действия возбуждающих аминокислот - глутамата и аспартата [2]. В некоторых модельных системах таурин проявляет себя как антагонист NMDA-рецепторов [9]. Известно, что наибольшее количество таурина обнаруживается в возбудимых тканях. В центральной нервной системе таурин обеспечивает защиту нервных клеток от эксайтотоксического повреждения [9]. Снижение его содержания приводит к увеличению повреждаемости тканей свободными радикалами [10].

То обстоятельство, что в течение первых 5 лет от начала заболевания (I группа пациентов) в плазме крови наблюдается повышение уровня таурина, сочетается с его известной способностью смягчать проявления окислительного стресса, компенсируя развитие патологического процесса. Вероятно, что у пациентов, болеющих в среднем более 5 лет (II группа) и получивших за время

болезни большое количество ДОФА-препаратов, организм в значительной степени утрачивает компенсаторную реакцию на окислительный стресс и оказывается не в состоянии снижать токсическое действие ДОФА путем повышения уровня таурина. Лазеротерапия, проводимая при лечении этих больных, достоверно снижает неврологический дефицит, что одновременно сопровождается повышением в их крови уровня таурина.

Полученные нами данные находят подтверждение в литературе. Известно, что через 3-5 лет от начала лечения ДОФА-препаратами у больных наступает снижение чувствительности к ДОФА-терапии, быстрее начинает прогрессировать заболевание, нарастают проявления деменции [11]. Мы предположили, что уровень таурина в крови может являться маркером как выраженности патологического процесса, так и наличия компенсаторных резервов организма. Действительно, у больных I группы, находящихся в начальной стадии заболевания, отмечается высокая корреляция между содержанием в крови таурина и глутамата; отсутствие значимой корреляции между уровнем этих аминокислот для больных II группы можно рассматривать как признак истощения компенсаторных механизмов. Интересно, что лазеротерапия позволяет не только улучшить неврологическую симптоматику и нормализовать соотношение таурина и глутамата у второй группы пациентов, но и восстановить корреляцию между содержанием этих аминокислот.

Таким образом, можно заключить, что начальный (пятилетний) период БП является предельным сроком, по прошествии которого начинается истощение компенсаторной системы организма. Выявляющаяся в обеих группах пациентов отрицательная корреляция между содержанием таурина и активностью СОД позволяет предполагать, что недостаток таурина может компенсироваться повышением активности этого антиоксидантного фермента в форменных элементах крови. Недавно было показано, что NMDA-рецепторы содержатся не только в нейронах головного мозга, но и в форменных элементах крови [12, 13]. Можно предположить, что дефицит внеклеточного "тауринового буфера" вызывает активацию внутриклеточных антиоксидантных ферментов вследствие систематической активации NMDA-рецепторов, приводящей к избыточной продукции свободных радикалов внутри клетки. Этому объяснению соответствует наличие участка связывания таурина на внеклеточной стороне NMDA-рецептора, который оказывает тормозное влияние на запуск патологических (эксайтотоксических) реакций, приводящих к активации свободнорадикальных механизмов [9]. Следовательно, повышение активности СОД у пациентов второй группы можно рассматривать как следующий компенсаторный уровень, проявляющийся при недостаточном содержании таурина. Вероятно, однако, что повышения активности СОД оказывается недостаточным для эффективной защиты от окислительного стресса, поскольку это не приводит к снижению тяжести заболевания в условиях активации MAO B, происходящей на этих же (поздних) стадиях развития болезни.

Важным аспектом обнаруженных закономерностей является то обстоятельство, что лазеротерапия обладает положительным действием как на неврологическое состояние пациентов, так и на систему возбуждающих и тормозных аминокислот в крови. Можно предположить, что положительный клинический эффект лазеротерапии при БП связан с ее модулирующим влиянием на механизмы, управляющие взаимодействиями между неферментативными (таурин) и ферментативными (СОД) факторами антиоксидантной защиты тканей.

Адаптационный ответ на действие лазерного излучения имеет гетерогенный характер, что выявляется при анализе как содержания в крови возбуждающих и тормозных аминокислот и антирадикальных ферментов, так и активности MAO B и, соответственно, неврологических показателей обследованных пациентов. Проведенное исследование показывает, что как уровень эксайтотоксических аминокислот в плазме крови, так и другие биохимические показатели (активность

МЕДИАТОРНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКЕНСОНА

МАО В и СОД в форменных элементах крови) в определенной степени отражают изменения, протекающие в мозге пациентов с БП, и могут отражать как глубину заболевания, так и эффективность его лечения.

Авторы приносят благодарность заведующим лабораторией нейрохимии профессору Болдыреву А.А. и руководителю отделения нейрогенетики НИИ неврологии РАМН профессору Ивановой-Смоленской И.А. за полезные дискуссии по теме исследования.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 00-04-48767 и 03-04-48767 и грантом ведущих научных школ РФ №1760.2003.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Olney, S.W.* (1971) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **30**, 75-90.
2. *Бархатова, В.П.* (1988) Нейротрансмиттеры и экстрапирамидная патология, Медицина, Москва.
3. *Раевский К.С.* (1990) Патол. физиол. эксп. терапия, №1, 3-9.
4. *Шток В.Н., Иванова-Смоленская, И.А., Левин О.С.* (2002) Экстрапирамидные расстройства, МЕДпрессинформ, Москва.
5. *Витрещак Т.В., Полещук В.В., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Стволинский С.Л., Крамаренко Г.Г.* (2002) *Нейрохимия*, **19** (3), 213-218.
6. *Витрещак Т.В., Полещук В.В., Михайлов В.В., Стволинский С.Л., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Пирадов М.А.* (2003) Вопросы биол. мед. фармацевт. хим., № 2, 33-38.
7. *Чичук Т.В., Страшкевич И.А., Клебанов Г.И.* (1999) Вестник РАМН, №2, 27-32.
8. *Витрещак Т.В.* (2003) Исследование активности моноаминооксидазы В и антиоксидантных ферментов в крови пациентов с болезнью Паркинсона. Дисс. канд. биол. наук, Российский университет дружбы народов, Москва.
9. *Болдырев А.А.* (2000) Бюлл. эксп. биол. мед., **130**, №9, 244-251.
10. *Lazzarin G., Corsico N., Tavazzi B., Di Pierro D. Arrigoni-Martelli E.* (1997) *Cardiol.*, **37**, 715-717.
11. *Agid Y.* (2001) *Neurology*, **57** (Suppl. 3), 46-51.
12. *Костонян И.А., Наволодская Е.В., Нуриева Р.И., Завьялов В.П., Липкин В. М.* (1997) Биоорг. хим., **23**, 805-808.
13. *Lombardi G., Dianzani C., Miglio G., Canonico PL., Fantozzi R.* (2001) *British J. Pharmacol.*, **133** (6), 936-944.

Поступила 16.05.2003

CONTENTS OF NEUROMEDIATORY AMINO ACIDS IN HUMAN BLOOD PLASMA DURING PARKINSON'S DISEASE

Vitreshchak T.V., Poleshchuk V.V., Piradov M.A.

Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Volokolamskoe shosse 80, 125367 Moscow, Russia

Content of neurotransmitter amino acids before and after treatment with He-Ne-laser was measured in blood of two groups of the Parkinson's disease patients distinguished by low (first group) and high (second group) activity of monoamine oxidase B and Cu/Zn-superoxide dismutase. An increase in taurine level at the early stage of the disease (first group of patients) suggests that taurine may be a marker of compensatory abilities of the organism. The violation of the glutamate/taurine balance at the later stages of the disease and its normalization following the laserotherapy accompanied improvement of neurological symptoms.

Key words: Parkinson's disease, neuromediatory amino acids, taurine, glutamate.