

Антитела к глутамату, нейродегенеративные повреждения головного мозга. Перспективы иммунотерапии

ДАВЫДОВА Т.В., КОЛОБОВ В.В., ГОРБАТОВ В.Ю., ЗАХАРОВА И.А.,
ВЕТРИЛЭ Л.А., ФОМИНА В.Г., ФЕДЕНКО А.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, Москва, Россия

В современных представлениях о нейробиологических и патофизиологических механизмах развития нейродегенеративных повреждений головного мозга, таких, как болезнь Альцгеймера, ишемические и травматические повреждения мозга и др., ключевая роль отводится нарушениям в глутаматергической системе мозга, в частности избыточному высвобождению возбуждающего нейротрансмиттера глутамата. Роль избыточного высвобождения глутамата и аспартата в патогенезе ишемического инсульта мозга подтверждена большим количеством исследований, обобщенных в монографии Е.И. Гусева и В.И. Скворцовой (2001) [1]. Доказательствами вовлечения глутаматергической системы в механизмы развития болезни Альцгеймера являются следующие факты: глутамат является быстрым нейротрансмиттером в структурах мозга, обеспечивающих механизмы памяти и обучения в коре больших полушарий, гиппокампе и ядрах Мейнерта. Вместе с тем, при определенных условиях глутамат может проявлять эксайтотоксические свойства и непосредственно участвовать в процессе нейродегенерации. Полученные в экспериментальных условиях данные подтверждают участие глутаматопосредованной эксайтотоксичности в нейрональной дегенерации альцгеймеровского типа [16]. Ряд авторов отмечает совместную локализацию глутаматергических нейронов и патологических изменений (нейрофибрилярные сплетения, сенильные бляшки), обнаруживаемые при посмертном исследовании головного мозга больных болезнью Альцгеймера [13]. При этом установлено, что тяжесть клинических проявлений деменции коррелирует с дефицитом ассоциативных глутаматергических волокон.

Глутамат — возбуждающий нейротрансмиттер в центральной нервной системе, обеспечивающий множественный ответ нейрона на разнообразные физиологические и биохимические стимулы, которые реализуются через различные глутаматные рецепторы. Особый интерес представляют NMDA-рецепторы, активация которых в нормальных условиях связана с пластичностью структур центральной нервной системы и участвует в таких процессах как обучение и память [14]. Отличительной особенностью NMDA-рецепторов является то, что они блокируются ионами магния по потенциал-зависимому механизму. Этот механизм работает при физиологических условиях, но ослабляется при снижении потенциала покоя [20]. При патологии избыточная длительная активация этих рецепторов глутаматом может приводить к гибели нейронов. Избыточный выброс в постсинаптическую щель глу-

тамата, что приводит к гиперактивации постсинаптических глутаматных рецепторов, в частности NMDA-рецепторов, и, как следствие, к нарушению проницаемости ионных каналов. Избыточная активация глутаматных рецепторов сопровождается массивным поступлением в нейроны ионов кальция и натрия, что приводит к деполяризации мембраны и активации кальциевых каналов, что свою очередь сопровождается еще большим увеличением поступления кальция в клетку. Индуцированное глутаматом повышение содержания кальция в нейронах вызывает каскад реакций с активацией протеолитических ферментов и разрушением клеточных структур, ведет к увеличению синтеза оксида азота, возрастанию перекисного окисления липидов (ПОЛ) с последующим развитием окислительного стресса, нарушением синтеза нейротрофических факторов, а также к апоптозу. Нейроны и астроглия участвуют в поддержании определенной концентрации глутамата в синаптической щели за счет высокоаффинного натрий зависимого транспорта. Повреждение обратного захвата глутамата, связанное с нарушением работы транспортеров в нейронах и астроцитах, играет важную роль в механизмах развития ишемических и нейродегенеративных повреждений мозга [19].

В последнее десятилетие получены данные свидетельствующие о реализации нейротоксического действия β -амилоида и его фрагментов через усиление эксайтотоксических свойств возбуждающих аминокислот, в частности глутамата [17].

Особый интерес в настоящее время представляет механизм регуляции ЦНС иммунной системой в виде продукции аутоантител к нейромедиаторам, которые являются важным звеном во взаимодействии нервной и иммунной систем. С одной стороны, антитела к нейромедиаторам, участвуя в дисрегуляционных процессах между нервной и иммунной системами, могут быть одной из причин развития нейроиммунопатологических процессов в ЦНС. С другой стороны, антитела к нейромедиаторам могут выступать как эндогенные протективные вещества, участвующие в саногенетических механизмах при нейроиммунопатологии. Так, установлено защитное действие антител к серотонину на моделях алкоголизма [3, 9], наркомании [7], паркинсонизма [9], антител к глутамату при экспериментальной эпилепсии [8], нейропатическом болевом синдроме [10].

В последние годы установлено образование аутоантител к глутамату при болезни Альцгеймера, хроническом нейродегенеративном заболевании головного мозга

[4—6]. Выявлены особенности образования аутоантител к глутамату у больных с разными формами болезни Альцгеймера. Низкий уровень аутоантител к глутамату в сыворотках крови обнаружен у больных с ранним началом заболевания, в то время как у больных с поздним началом болезни Альцгеймера содержание этих антител в сыворотках крови было высоким. Показано, что уровень аутоантител к глутамату в сыворотках крови больных зависит от тяжести развития болезни Альцгеймера, причем существенное увеличение содержания аутоантител к глутамату наблюдается в период развития умеренной деменции.

На широко используемых экспериментальных моделях болезни Альцгеймера, вызванной введением в ядра гигантоклеточные Мейнерта токсического фрагмента $A\beta_{25-35}$, и ишемического повреждения префронтальной коры мозга, вызванной фотохимическим тромбозом, характеризующихся развитием когнитивных нарушений, показано защитное действие антител к глутамату на расстройства памяти. Так, интраназальное введение антител к глутамату в дозе 300 мкг/кг улучшало воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера и полностью восстанавливало память у крыс через час после нанесения ишемического повреждения префронтальной коры [2, 11]. В механизмах защитного действия на расстройства памяти при ишемическом повреждении префронтальной коры головного мозга лежит специфическое действие антител к глутамату на содержание глутамата в структурах мозга, снижая его накопление и тем самым предотвращая гибель нейронов [12].

Согласно современным представлениям для хронических нейродегенеративных повреждений головного мозга характерен ряд патохимических процессов связанных между собой, включающих мутации предшественника амилоидного пептида, ведущих к образованию токсических форм амилоидов, образование нейрофибриллярных сплетений, отложение амилоидных бляшек, холинергический дефицит в передних отделах головного мозга, образование эксайтотоксических продуктов, развитие окислительного стресса, апоптоз. Несомненный интерес представляет в изучении механизмов действия антител к глутамату влияние их на процессы апоптоза.

В последнее время особое внимание уделяется изучению роли каспазозависимых процессов апоптоза в механизмах развития БА. Получены убедительные свидетельства, что увеличение активности каспазы-3 — ключевого фермента апоптоза является причиной гибели нейронов и способствует формированию сенильных бляшек при БА [23]. Установлено также усиление апоптоза в нервных клетках головного мозга при спорадических и семейных формах БА [15].

В качестве модели хронического нейродегенеративного повреждения мозга использовалась модель экспериментальной болезни Альцгеймера, вызванная введением нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$, который обладает нейротоксическими свойствами, реализующимися через различные механизмы, а именно через усиление эксайтотоксических свойств глутамата, нарушение гомеостаза ионов кальция, усиление окислительного стресса, индукцию апоптоза и энергетическое истощение клеток [17].

В работе использовались антитела к глутамату, которые получали от кроликов, иммунизированных по стандартной схеме конъюгатом глутамат-БСА, синтезированным модифицированным методом с помощью бифункционального реагента глутаральдегида [22]. Титр антител к глутамату, определяемый методом иммуноферментного анализа, составил 1:1000. γ -Глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом пересадки сульфатом аммония, очищали от БСА методом аффинной хроматографии [3]. Лиофилизировали и хранили при 4°C. Для интраназального введения животным готовили водный раствор антител к глутамату непосредственно перед началом эксперимента.

У крыс вызывали развитие нейродегенеративного повреждения мозга, двусторонним введением нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$ в количестве 2 мкл. раствора в дозе 2 мкг с каждой стороны.

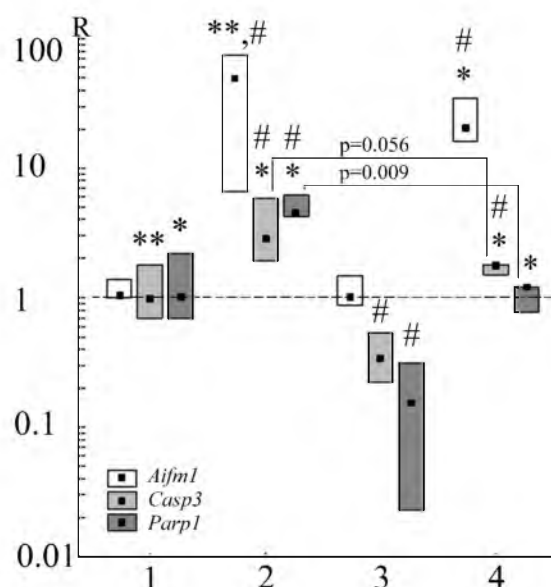
В первой серии экспериментов крысы были разделены на пять групп: И — интактные, ЛО — ложнооперированные; $A\beta_{25-35} + H_2O$ — крысы с двусторонним введением нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$, которым через 1 ч после операции вводили интраназально по 10 мкл дистиллированной воды; $A\beta_{25-35} + ГЛ-АТ$ — животные, которым по той же схеме вводили интраназально водный раствор антител к глутамату в дозе 300 мкг/кг; $A\beta_{25-35} + \gamma$ глобулин — животные, которым в качестве контроля вводили водный раствор кроличьего γ -глобулина от интактных животных по той же схеме и в той же дозе.

Через 1, 3 и 14 суток в структурах мозга: префронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе определяли активность каспазы-3 колориметрическим методом основанном на гидролизе ацетил-асп-глу-вал-асп-р-нитроанилида. Активность каспазы-3 выражали в процентах по отношению к контрольной группе интактных крыс, принятую за 100%. Для подтверждения специфичности гидролиза ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-п-нитроанилида каспазой-3 опытные пробы дополнительно инкубировали в присутствии 20 мкМ ингибитора каспазы-3 Ac-DEVD-CHO (A-0835, «Sigma-Aldrich», США). В качестве отрицательных контролей отдельно инкубировали аликваты супернатантов без добавления субстрата для каспазы-3.

У крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера наблюдалась существенная активация каспазы-3 ключевого фермента апоптотической гибели нейронов в префронтальной коре головного мозга уже на 1 сутки после введения в базальные гигантоклеточные ядра Мейнерта. Увеличение активности каспазы-3 было зарегистрировано также на 3 сутки после операции, причем ее активность была выше, чем в 1 сутки наблюдения. В гиппокампе увеличение активности каспазы-3 наблюдали только на 3 сутки после введения нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$ в ядра Мейнерта. Изменения активности каспазы-3 в гипоталамусе на всех сроках наблюдения выявлено не было. Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными, свидетельствующими о том, что нейротоксический фрагмент β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$ индуцирует нейрональный апоптоз [21]. Интраназальное введение антител к глутамату через час после введения $A\beta_{25-35}$ приводило к снижению активности каспазы-3 в префронтальной коре головного мозга по сравнению с группой животных с $A\beta_{25-35} + H_2O$ как в 1

сутки, так и на 3 сутки после операции. Сходные изменения в активности каспазы-3 при интраназальном введении антител к глутамату наблюдались в гиппокампе. Так, активность каспазы-3 в префронтальной коре мозга была $100 \pm 5,0\%$ в интактной группе, $100 \pm 2,45\%$ в ложнооперированной группе, $136,3 \pm 9,1\%$ в группе с $A\beta_{25-35} + H_2O$, $92,3 \pm 4,1\%$ в группе $A\beta_{25-35} + \text{ГЛ-АТ}$, $112 \pm 3,1\%$ в группе $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин ($H(4, N=30)=22,336$, $p=0,0001$) на 3 сутки после введения $A\beta_{25-35}$. Активность каспазы-3 в гиппокампе была $100 \pm 2,1\%$ в интактной группе, $99,2 \pm 1,5\%$ в ложнооперированной группе, $114,5 \pm 1,0\%$ в группе с $A\beta_{25-35} + H_2O$, $65,3 \pm 5,6\%$ в группе $A\beta_{25-35} + \text{ГЛ-АТ}$, $100,6 \pm 1,1\%$ в группе $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин ($H(4, N=30)=23,023$, $p=0,0001$). Интраназальное введение антител к глутамату не оказывало влияния на активность каспазы-3 в гипоталамусе. Интраназальное введение γ -глобулина крысам в качестве контроля через час после введения $A\beta_{25-35}$ не оказало существенного влияния на активность каспазы-3 у крыс экспериментальной БА. На 14 сутки после введения $A\beta_{25-35}$ в гигантоклеточные ядра Мейнерта изменений в активности каспазы-3 во всех исследованных структурах выявлено не было.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что интраназальное введение антител к глутамату через час после введения ней-



Изменение экспрессии генов *Aifm1*, *Casp3* и *Parp1* в префронтальной коре крыс (медиана \pm 25–75% квантили)

По оси абсцисс обозначения групп животных: 1 – группа ложнооперированных животных; 2 – группа крысы с двусторонним введением нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$, которым через 1 ч после операции вводили интраназально по 10 мкл дистиллированной воды; 3 – группа животных с двусторонним введением нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$, которым через 1 ч после операции вводили интраназально по 10 мкл водный раствор антител к глутамату в дозе 300 мкг/кг; 4 – группа животных, которым в качестве контроля вместо антител к глутамату вводили водный раствор кроличьего γ -глобулина от интактных животных по той же схеме и в той же дозе. По оси ординат в логарифмической шкале указан относительный уровень экспрессии генов (R). За единицу принят уровень экспрессии генов в контрольной группе интактных крыс (пунктирная линия).

Уровни достоверности различий: # – $p < 0,01$ по сравнению с группой (I); * – $p < 0,01$, ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой ($A\beta_{25-35}$ + антитела к глутамату)

ротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$ ядра Мейнерта приводит к существенному снижению активности каспазы-3 основного фермента, участвующего в апоптотической гибели нервных клеток в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе у крыс на ранней стадии экспериментальной болезни Альцгеймера. В связи с этим представляло интерес провести молекулярно-генетическую оценку влияния интраназального введения антител к глутамату на уровень экспрессии мРНК проапоптотической каспазы-3 (*Casp3*), индуцирующего апоптоз фактора (*Aifm1*), и поли(ADP-рибозо)полимеразы-1 (*Parp1*) в префронтальной коре крыс 3 сутки после введения $A\beta_{25-35}$ в гигантоклеточные ядра Мейнерта.

Во второй серии экспериментов из образцов префронтальной коры РНК выделяли тризолом («Invitrogen», США). Анализ экспрессии мРНК генов проводился посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) после этапа обратной транскрипции с применением ревертазы M-MLV («Promega», США) и с регистрацией продукта амплификации в режиме реального времени на амплификаторе «ДТ-322» («ДНК-Технология», Россия). Программа амплификации: 94°C – 1,5 мин; 50 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров (структура и температура отжига указаны в таблице) – 15 с, элонгация при 72°C – 30 с. В отрицательных контролях, содержащих деионизированную воду вместо комплементарной ДНК, амплификация отсутствовала. Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали, как указано в работе [18]; ген *Actb* – внутренний контроль.

На рисунке показано, что к 3 суткам у крыс с введением нейротоксина $A\beta_{25-35}$ в гигантоклеточные ядра Мейнерта изменяется транскриптомный состав клеток префронтальной коры в направлении программируемой гибели: увеличивается в 49 раз содержание мРНК гена *Aifm1*, в 2,8 раза – количество мРНК гена *Casp3*, в 4,5 раза – количество мРНК гена *Parp1*. Антитела к глутамату достоверно нивелируют повышенную экспрессию генов *Aifm1*, *Casp3*, *Parp1* у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера. Нормализация уровней экспрессии генов *Aifm1* и *Casp3* строго специфична для антител к глутамату, поскольку в группе крыс, которые получали после операции водный раствор γ -глобулина от не иммунизированных кроликов, уровни экспрессии этих генов статистически значимо увеличены по отношению к интактным животным.

Показано выраженное снижение антителами к глутамату уровня экспрессии гена *Parp1* в префронтальной коре, однако водный раствор γ -глобулина также вызывает те же изменения, но они менее выражены.

Сходные нейропротективные эффекты антител к глутамату в отношении экспрессии генов *Aifm1* и *Casp3* в гиппокампе.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что интраназальное введение антител к глутамату через час после введения нейротоксического фрагмента β -амилоидного белка $A\beta_{25-35}$ в гигантоклеточные ядра Мейнерта, приводит к модуляции транскрипционной активности ключевых медиаторов программируемой гибели клеток в префронтальной коре крыс и гиппокампе, снижая экспрессию генов индуцирующего апоптоз фактора, каспазы-3, препятствуя тем самым развитию каскада программ гибели нейронов и глии. Молекулярный механизм

действия антител к глутамату в программируемой гибели нейронов на сегодняшний день не известен. Наиболее вероятным механизмом может быть, во-первых, коррекция нарушений нейромедиаторного дисбаланса, в частности глутамата, в структурах мозга при нейродегенеративных повреждениях, во-вторых, нельзя исключить опосредованное их влияние на активность NMDA рецепторов, что требует дальнейшего изучения.

Подводя итоги, следует отметить, что антитела к глутамату, образующиеся в организме при патологии нервной системы, включая нейродегенеративные повреждения головного мозга, являются эндогенными бирегуляторами нейроиммунных процессов, обладающими защитными свойствами против эксайтотоксического действия глутамата. Полученные данные позволяют надеяться, что антитела к глутамату смогут найти свое место при разработке иммунотерапии нейродегенеративных повреждений головного мозга, а также других форм нейропатологии.

Список литературы

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.
2. Горбатов В.Ю., Трекова Н.А., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Антиамнестическое действие антител к глутамату при экспериментальной болезни Альцгеймера // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — Т. 150, №7. — С. 2—30.
3. Давыдова Т.В., Фомина В.Г., Башарова Л.А., Феденко А.М. Подавление потребления алкоголя при интраназальном введении антител к серотонину у мышей C57Bl/6 // Бюлл. эксперим. биол. — 2005. — Т. 140, №12. — С. 639—642.
4. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Фомина В.Г., Ветрилэ Л.А., Доронина О.А. Индукция аутоантител к глутамату у больных болезнью Альцгеймера // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 624—626.
5. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Фомина В.Г., Ветрилэ Л.А., Доронина О.А. Индукция аутоантител к глутамату у больных Альцгеймера // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2007. — Т. 143, №2. — С. 140—141.
6. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Горбатов В.Ю., Фомина В.Г., Доронина О.А., Максимова И.В. Особенности образования аутоантител к глутамату при деменциях альцгеймеровского типа // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2009. — Т. 147, №4. — С. 385—387.
7. Евсеев В.А. Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии. — М.: Изд. РАМН, 2007. — 144 с.
8. Карпова М.Н., Ветрилэ Л.А., Клишина Н.Ю., Трекова Н.А., Кузнецова Л.В., Евсеев В.А. Повышение порогов судорожной реакции к конвульсанту коразолу после активной иммунизации конъюгатом глутамат-БСА мышцей разных генетических линий // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №9. — С. 286—289.
9. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В., Сепишвили Р.И. // Нейроиммунопатология: Руководство. — М., 2003. — 437 с.
10. Кукушкин М.Л., Игонькина С.И., Ветрилэ Л.А., Евсеев В.А. Влияние антител к глутамату и ГАМК на развитие центрального болевого синдрома // Боль: научно-практический журнал. — 2007. — №3. — С. 8—11.
11. Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю., Квашенникова Ю.Н., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на сохранение условного рефлекса пассивного избегания у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2010. — Т. 149, №3. — С. 261—264.
12. Романова Г.А., Квашенникова Ю.Н., Шакова Ф.М., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на содержание нейротрансмиттерных аминокислот в структурах мозга крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2012. — Т. 153, №1. — С. 17—20.
13. Braak H., Braak E. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder // Neurobiol. Aging. — 1994. — Vol. 15. — P. 355—380.
14. Danyz W., Parsons C.G., Quack G. NMDA channel blockers: memantine and amino-alkylcyclohexanes — in vivo characterization // Amino Acids. — 2000. — Vol. 19, №1. — P. 167—172.
15. Eckert A., Marques C.A., Keil U. et al. Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2003. — Vol. 1010. — P. 604—609.
16. Harkany T., Abraham I., Timmerman W. et al. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis // Eur. J. Neurosci. — 2000. — Vol. 12. — P. 2735—2745.
17. Harkany T., Penke B., Luiten P.G. Beta-amyloid excitotoxicity in rat magnocellular nucleus basalis. Effect of cortical deafferentation on cerebral blood flow regulation and implications for Alzheimer's disease // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2000. — Vol. 903. — P. 374—386.
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. — 2001. — Vol. 25, №4. — P. 402—408.
19. Maragakis N.J., Rothstein J.D. Glutamate transporters in neurologic disease // Arch. Neurol. — 2001. — Vol. 58, №3. — P. 365—370.
20. Meldrum B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130 (4S Suppl). — P. 1007—1015.
21. Morishima Y., Gotoh Y., Zieg J. et al. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand // J. Neurosci. — 2001. — Vol. 21, №19. — P. 7551—7560.
22. Seguela P., Geffard M., Buijs R.M., Le Moal M. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunochemical results // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81, №12. — P. 388—392.
23. Su J.H., Zhao M., Anderson A.J. et al. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology // Brain Res. — 2001. — Vol. 898, №22. — P. 350—357.