

Роль антител к ГАМК и глутамату в патогенезе невропатического болевого синдрома

Игонькина С.И., Графова В.Н., Смирнова В.С.,
Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Евсеев В.А., Кукушкин М.Л.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН,
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8, e-mail: labpain@rambler.ru

На моделях невропатических болевых синдромов проведено изучение роли антител к тормозному нейромедиатору ГАМК и возбуждающему нейромедиатору глутамату в патогенетических механизмах невропатической боли. Показано, что развитие экспериментального невропатического болевого синдрома сопровождается продукцией аутоантител к глутамату и ГАМК. Установлено, что антитела к тормозному нейромедиатору ГАМК оказывают проноцицептивное действие, вызывая механическую аллодинию, а антитела к возбуждающему нейромедиатору глутамату оказывают антиноцицептивное обезболивающее действие, подавляя спонтанные приступы боли.

Ключевые слова: антитела к ГАМК, антитела к глутамату, невропатический болевой синдром, спонтанные приступы боли, аллодиния

Введение

Современные данные литературы свидетельствуют о существенной роли иммунологических факторов в патогенезе неврологических заболеваний. Антитела, направленные против нейромедиаторов и их рецепторов, обнаруживаются при синдроме Гийена—Барре, мультифокальной моторной невропатии, рассеянном склерозе, эпилепсии, у пациентов с геморрагическим и ишемическим инсультом [4, 8, 10, 11, 16]. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что развитие у животных невропатического болевого синдрома, вызванного перерезкой седалищного нерва, сопровождается образованием аутоантител к серотонину, норадреналину и дофамину, а иммунизация животных антигеном, конъюгированным с вышеперечисленными нейромедиаторами, обостряет течение экспериментального невропатического болевого синдрома [2, 3]. В настоящее время открытым остается вопрос о роли антител к тормозному нейромедиатору ГАМК и к возбуждающему нейромедиатору глутамату в патогенезе невропатической боли. В то же время среди многочисленной группы нейромедиаторов и нейромодуляторов, опосредующих проведение и контроль ноцицептивных сигналов в ЦНС, эти нейромедиаторы играют важную роль, а антитела к ним могут существенно влиять на баланс торможение — возбуждение в ноцицептивной системе, усиливая или ослабевая нейрональную сенситизацию.

Глутамат вместе с субстанцией Р является главным нейромедиатором, опосредующим передачу ноцицептивных сигналов в спинном мозге и супраспинальных центрах [15]. Под действием ноцицептивных импульсов глутамат выделяется из центральных афферентных терминалей и взаимодействует с несколькими подтипами ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов, являясь ключевым звеном в запуске синаптических, внесинаптических и внутринейрональных процессов при патологической боли [6, 14].

Тормозный нейромедиатор ГАМК играет важную роль в контроле проведения ноцицептивных сигналов. В результате секреции ГАМК происходит снижение выделения возбуждающих медиаторов из центральных терминалей первичных афферентов и осуществляется торможение ак-

тивности ноцицептивных нейронов дорсального рога [17]. Дефицит ГАМКергического торможения приводит к развитию аллодинии и пароксизмов боли [4, 6]. И наоборот, использование агонистов ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов у пациентов с невропатическими болевыми синдромами показывает их высокую терапевтическую эффективность [12, 13].

Целью настоящей работы было изучение возможности образования аутоантител к ГАМК и глутамату при невропатической боли, а также изучение влияния антител к тормозному нейромедиатору ГАМК и возбуждающему нейромедиатору глутамату на развитие невропатической боли.

Материалы и методы

Работа выполнена на 62 крысах-самцах линии Wistar массой 220—250 г в соответствии с этическими требованиями, предусмотренными Международной и Российской ассоциациями по изучению боли при проведении поведенческих и нейрофизиологических исследований на животных [18].

Иммунологические методы

Аутоантитела к нейромедиаторам в сыворотке крови животных исследовали с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа, проводимого на полистироловых планшетах, сенсibilизированных соответствующими тест-антигенами. Тест-антигены: глутамат — бычий сывороточный альбумин и ГАМК — бычий сывороточный альбумин синтезировали по описанному ранее методикам [2, 3]. Содержание антител оценивали по оптической плотности сыворотки крови при длине волны 495 нм с использованием считывающего устройства «MINI-READER» фирмы «DYNATECK» (Швейцария) и выражали в условных единицах активности (усл.ед.) показателем К, представляющим собой отношение оптической плотности сыворотки крови каждого подопытного животного к среднему значению оптической плотности сыворотки интактных крыс. О наличии антител свидетельствовало значение К больше единицы

Антитела к глутамату и ГАМК получали путем гипериммунизации кроликов антигенами, конъюгированными

ми соответственно с глутаматом или ГАМК (глутамат—бычий сывороточный альбумин, ГАМК — бычий сывороточный альбумин). Конъюгаты получали реакцией ковалентного связывания соответствующего гаптена с диазотированным белком по стандартной методике [2, 3]. Антитела в виде гамма-глобулиновых фракций выделяли из сыворотки крови методом переосаждения сульфатом аммония, очищали путем диализа и лиофилизировали. Аналогичным образом выделяли гаммаглобулиновую фракцию у интактных, неиммунизированных кроликов, которую использовали для контрольных животных.

Моделирование невропатической боли

В работе использованы две модели невропатической боли: модель периферической невропатической боли и модель центрального болевого синдрома.

Модель периферической невропатической боли создавали повреждением седалищного нерва. Для этого у животных в условиях гексеналового наркоза обнажали нерв на левой задней конечности, и после наложения лигатуры нерв перерезали дистальнее места перевязки. О возникновении у животных невропатического болевого синдрома свидетельствовала реакция аутономии, т.е реакция самоповреждения пальцев ипсилатеральной задней конечности. Для оценки выраженности невропатической боли использовали 11-балльную шкалу степени аутономий. Тяжесть процесса оценивали с помощью общепринятой шкалы интенсивности повреждения когтей, фаланг и стоп оперированной лапы [9]. Динамику процесса учитывали ежедневно на протяжении 28 дней после операции. При аутономии в 11 баллов животные выводились из эксперимента и усыплялись летальной дозой нембутала.

Для моделирования центрального болевого синдрома животным под эфирным наркозом после ламинэктомии на дорсальную поверхность люмбального отдела спинного мозга (L4—L6) гомолатерально апплицировали агаровую пластинку размером 10×3×1,5 мм, содержащую в исходном растворе натриевую соль пенициллина (50 000 ЕД в 1 мл), который нарушал ГАМКергическое торможение и приводил к гиперактивации ноцицептивных нейронов в дорсальных рогах спинного мозга [4]. Для оценки спонтанных приступов боли использовали балльную шкалу: 0 — отсутствие спонтанных реакций в виде вокализации и двигательной реакции; 1 балл — спонтанная слабая одиночная вокализация и локальная спонтанная двигательная реакция в виде вычесывания кожных покровов задней лапы, ипсилатеральной по отношению к месту введения пенициллина; 2 балла — спонтанная умеренная неоднократная вокализация, локальное вычесывание и выкусывание соответствующей зоны, хаотическое подпрыгивание, пробежка; 3 балла — интенсивная спонтанная непрерывная вокализация, интенсивное выгрызание соответствующей зоны, быстрые спонтанные пробежки и вращения. Интенсивность спонтанных приступов боли оценивали по аккумулятивному показателю боли (АПБ), который рассчитывали по формуле:

$$\text{АПБ} = \text{В} \times \text{Т},$$

где:

В — показатель баллов, отражающий спонтанное болевое поведение животных;

Т — общая длительность приступов в фиксированном интервале времени (1 мин).

Аллодинию у животных с ЦБС также оценивали в баллах по вокализации и характеру двигательной реакции в ответ на тактильное касание кисточкой кожных покровов, топографически соответствующих L4—L6 сегментам спинного мозга: 0 — отсутствие реакции в ответ на легкое тактильное раздражение кожных покровов; 1 балл — слабый писк, двигательная реакция в виде отдергивания задней лапы; 2 балла — неоднократная вокализация, сопровождающаяся умеренной двигательной реакцией в виде избегания; 3 — сильная непрерывная вокализация, бурная реакция избегания с последующим хаотическим бегом по клетке либо кусанием кисточки. Зону распространения аллодинии определяли по количеству точек, тактильное раздражение которых вызывало болевую реакцию. Аккумулятивный показатель аллодинии (АПА), рассчитывали по формуле:

$$\text{АПА} = \text{В} \times \text{N},$$

где:

В — показатель баллов;

N — число точек.

Аутоантитела к нейромедиаторам в сыворотке крови животных с невропатическим болевым синдромом (n=30) определяли на 14 и 28 сутки после операции с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа, проводимого на полистироловых планшетах, сенсibilизированных соответствующими тест-антигенами. Контролем служили интактные животные (n=10)

Влияние антител к глутамату (n=5) и ГАМК (n=5) на развитие центрального болевого синдрома у крыс изучали при интратекальном введении антител в дозе 300 мкг на крысу. Животным контрольных групп аналогичным образом вводили 0,9% NaCl (n=6) или гамма-глобулин (n=6).

Статистическая и математическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excell (Ms Office XP SP3). Достоверность различий между группами определяли вычислением критерия F с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), метода Фишера, непарного параметрического t-критерия Стьюдента, критерий Вилкоксона. Данные представлены в виде (M±m), где M — среднее значение, а m — ошибка среднего значения.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов исследовали сыворотку крови животных с невропатическим болевым синдромом, вызванным повреждением седалищного нерва, на наличие антител к ГАМК и глутамату в динамике на 14-е и 28 сутки после операции. На 14-е сутки после операции аутономии регистрировали у 22 из 30 крыс. На этот срок их тяжесть в среднем составляла 5,9±0,79 балла. На 28-е сутки аутономии тяжестью в 7,87±0,94 балла отмечены у 23 из 30 крыс. Динамика развития невропатического болевого синдрома характеризовалась следующими особенностями (рис. 1 А, Б). На третьи сутки аутономии выявлены у 30% животных, на 6—10 сутки — у 60% и в последующие дни — у 76,6% оперированных крыс. Тяжесть болевого синдрома, как видно из рис. 1 Б, нарастала в той же последовательности. В контрольной группе животных аутономии не наблюдались.

На 14-е сутки аутоантитела к нейромедиатору глутамату выявлены у животных с невропатическим болевым

Частота выявления аутоантител к нейромедиаторам при невропатическом болевом синдроме

Показатели	Аутоантитела к глутамату		Аутоантитела к ГАМК	
	14 дней	28 дней	14 дней	28 дней
Частота выявления, %	64,5 **	41,9 *	66,7 **	17,2
К, усл. ед.	1,46±0,06 *	1,45±0,09 *	1,45±0,06 *	1,55±0,02 *

Примечание. * p<0,05; ** p<0,001 по сравнению с интактными животными

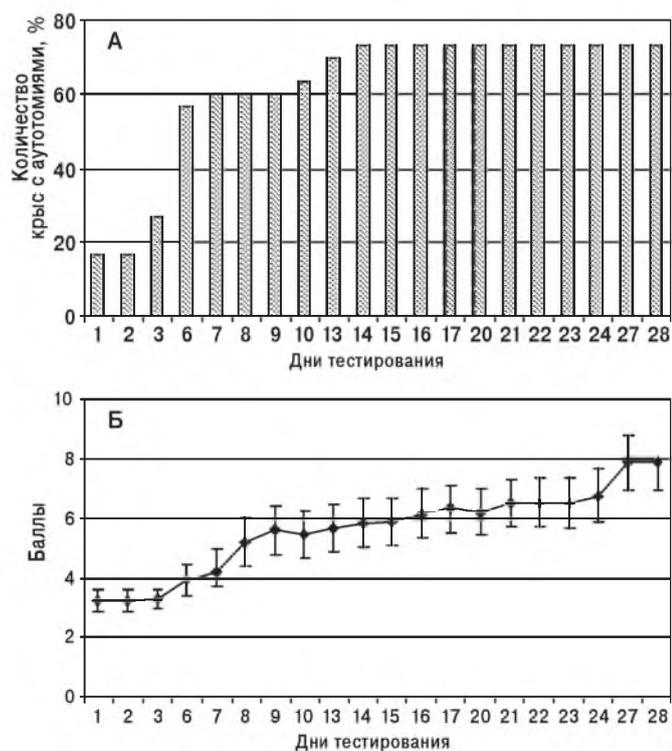


Рис. 1. Развитие невропатического болевого синдрома у крыс: А — процент животных с аутоотомиями; Б — выраженность невропатического болевого синдрома.

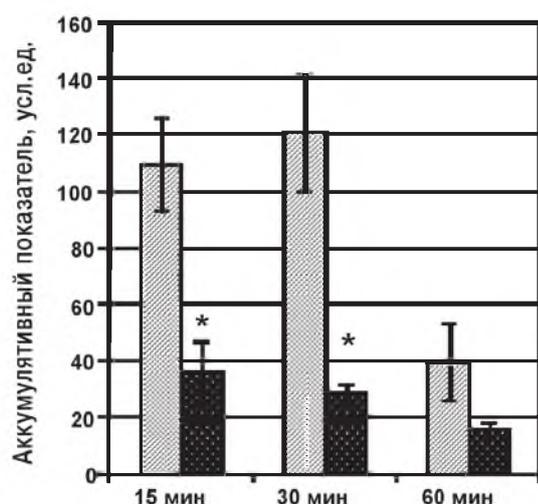


Рис. 2. Влияние интратекального введения антител к глутамату на спонтанные приступы у животных с центральным болевым синдромом. По оси ординат: аккумулятивный показатель спонтанных приступов боли, выраженный в условных единицах (заштрихованные столбики — введение 0,9% NaCl, темные столбики — введение антител к глутамату). По оси абсцисс: время после интратекального введения антител к глутамату. * — P<0,05 по сравнению с введением 0,9% NaCl

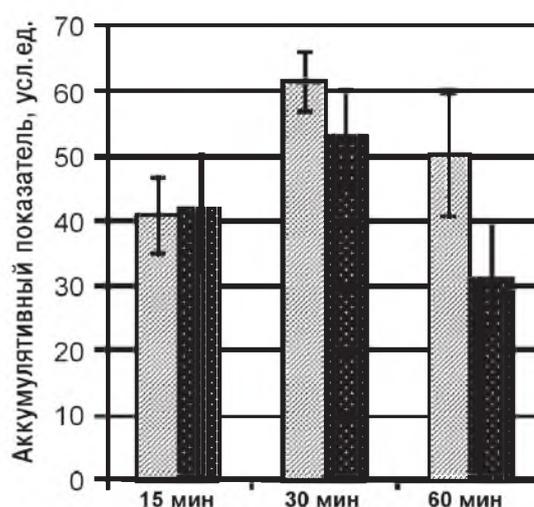


Рис. 3. Влияние интратекального введения антител к глутамату на аллодинию у животных с центральным болевым синдромом. По оси ординат: аккумулятивный показатель аллодинии, выраженный в условных единицах (заштрихованные столбики — введение 0,9% NaCl, темные столбики — введение антител к глутамату). По оси абсцисс: время после интратекального введения антител к глутамату.

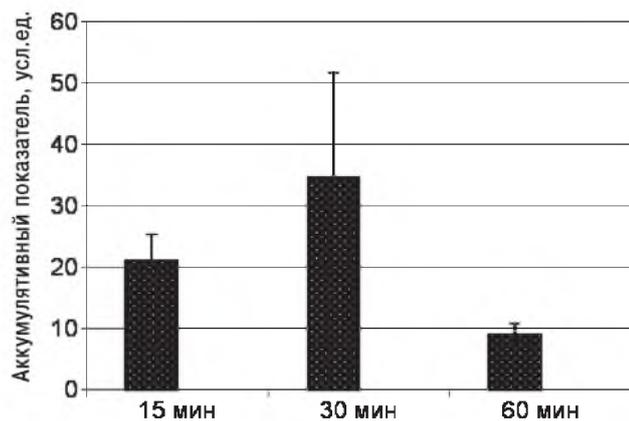


Рис. 4. Аллодиния, вызванная интратекальным введением антител к ГАМК.

По оси ординат: аккумулятивный показатель аллодинии, выраженный в условных единицах.

По оси абсцисс: время после интратекального введения антител к ГАМК.

циллином существенно подавляло интенсивность болевых пароксизмов по сравнению с контрольной группой животных (рис. 2; $P=0,009$ для АПБ на 15-й минуте; $P=0,002$ для АПБ на 30-й минуте) и не влияло на выраженность аллодинии (рис. 2, рис. 3).

Интратекальное введение интактным животным антител к ГАМК приводило к появлению у подопытных животных механической аллодинии (рис. 4). Легкое тактильное воздействие кисточкой на дерматомы, подвергшиеся воздействию антител к ГАМК, вызывало у всех животных стимул зависимую болевую реакцию. Начальные проявления аллодинии в виде писка при нанесении тактильного раздражения на кожу ипсилатеральной задней конечности возникали через 10–15 мин (АПА = $21,1 \pm 4,3$). К 30-й минуте после аппликации на дорсальную поверхность спинного мозга антител к ГАМК интенсивность и площадь аллодинии достигала максимальных значений (АПА = $34,6 \pm 17,08$), через 60 мин регистрировали ее минимальные значения (АПА = $9,2 \pm 1,6$).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные, свидетельствуют о том, что развитие невропатического болевого синдрома сопровождается продукцией аутоантител к тормозному нейромедиатору ГАМК и возбуждающему нейромедиатору глутамату. Анализ влияния антител к указанным нейромедиаторам позволил сделать следующее заключение о роли антител к нейромедиаторам в развитии невропатической боли: антитела к глутамату способствуют развитию антиноцицептивных реакций, в то время как антитела к ГАМК обладают проноцицептивным действием. Оба события указывают на изменение синаптической нейромедиации. Снижение антителами к глутамату эффективности глутаматергических влияний на ноцицептивные нейроны способствовало уменьшению их сенситизации и торможению болевых пароксизмов, в то время как снижение тормозных реакций антителами к ГАМК повышало возбудимость ноцицептивных нейронов и провоцировало развитие аллодинии.

В литературе имеются сообщения о том, что нейромодулирующие влияния антител могут опосредоваться как за счет изменения уровня нейромедиаторов, так и за счет изменения лигандсвязывающей активности соответствующих

рецепторов [1]. Ухудшение синаптической эффективности глутамата и ГАМК, наблюдаемое в нашем исследовании через 10–15 мин после аппликации соответствующих антител, скорее всего, обусловлено «нейтрализацией» (связыванием) антителами определенного количества нейромедиаторов. Данное предположение хорошо согласуется с отмеченным в настоящем исследовании фактом, демонстрирующим более эффективное подавление антителами к глутамату стимулонезависимой боли (спонтанные приступы) по сравнению со стимулозависимой болью (аллодиния), что, по всей видимости, обусловлено частичной (неполной) нейтрализацией возбуждающей глутаматергической сигнализации.

Ранее было показано, что для возникновения аллодинии требуется меньшее нарушение равновесия в системе «возбуждение-торможение» ноцицептивных нейронов, по сравнению со спонтанными приступами боли [5, 6], поэтому аллодиния возникает раньше и при меньшей степени сенситизации ноцицептивных нейронов.

В настоящее время важное значение в поддержании эффективности глутаматергической нейромедиации придается переносчикам глутамата — GLAST и GLT-1, локализованным на плазматической мембране как глиальных клеток, так и нейронов. Показано, что снижение экспрессии и GLAST, и GLT-1 в L4-5 задних рогах спинного мозга приводит к развитию гипералгезии у крыс [7]. Функциональное значение этих высокоаффинных переносчиков глутамата сводится к ограничению глутаматергической нейротрансмиссии. GLAST и GLT-1, связываясь с глутаматом, обеспечивают его элиминацию из синаптической щели. Аналогичным действием, по всей видимости, обладают и антитела к глутамату. Ограничивая длительность глутаматного воздействия на постсинаптическую мембрану, антитела к глутамату способствуют устранению патологической боли и могут рассматриваться в качестве нового обезболивающего средства.

Список литературы

1. Евсеев В.А., Трекова Н.А., Ветрилэ Л.А., Миковская О.И., Башарова Л.А., Грудень М.А., Хлопушина Т.Г. Нейромодулирующее влияние антител к серотонину на поведенческие реакции. уровень нейромедиаторов в ЦНС и лигандсвязывающую активность центральных серотониновых рецепторов у мышей линии C57Bl/6 и BALB/c // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2001. — Т. 132, №7. — С. 26–29.
2. Игошкина С.И., Крыжановский Г.Н., Зипкевич В.А., Башарова Л.А., Ветрилэ Л.А., Евсеев В.А., Решетняк В.К., Кукушкин М.Л. Влияние антител к серотонину на развитие невропатического болевого синдрома // Патол. физиол. и эксперим. терапия. — 1997. — №2. — С. 6–8.
3. Игошкина С.И., Крыжановский Г.Н., Кукушкин М.Л., Решетняк В.К., Зипкевич В.А., Башарова Л.А., Ветрилэ Л.А., Евсеев В.А. Влияние антител к дофамину на развитие невропатического болевого синдрома у крыс // Журнал ВНД им. И.П. Павлова. — 2000. — Т. 50, №6. — С. 999–1006.
4. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. — М.: Медицина, 1997. — 350 с.
5. Крыжановский Г.Н., Решетняк В.К., Зипкевич В.А., Игошкина С.И., Чалова В.В. Новая модель аллодинии // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1996. — Т. 122, №9. — С. 258–261.
6. Кукушкин М.Л., Хитров Н.К. Общая патология боли. — М.: Медицина, 2004. — 144 с.
7. Кукушкин М.Л., Тихоновский А.А. Молекулярные механизмы боли // Боль. — 2006. — №1. — С. 43–47.
8. Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммунофизиология. — М., 2005. — 158 с.

9. Осипов А.В., Кукушкин М.Л. Влияние стресса на развитие деафферентационного синдрома у крыс после перерезки седлищного нерва // Бюл.экспер.биол. — 1993. — Т. 115, №5. — С. 471—475.
10. Скоромец А.А., Дамбинова С.А., Илюхина А.Ю., Сорокумов В.А. Аутоантитела к глутаматным рецепторам NMDA-типа в крови пациентов с острым ишемическим и геморрагическим инсультом // Журнал неврологии и психиатрии. — 1997. — №6. — С. 53—58.
11. Сорокина Е.Г., Сторожевых Т.П., Сенилова Я.Е., Гранстрем О.К., Реутов В.П., Пинелис В.Г. Действие антител к AMPA-рецепторам глутамата на нейроны мозга в первичных культурах мозжечка и гиппокампа // Бюл. эксп. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №7. — С. 59—62.
12. Яхно Н.Н. Применение противосудорожных препаратов для лечения хронических неврогенных болевых синдромов // Антиконвульсанты в психиатрической и неврологической практике / Под ред. А.М. Вейна и С.Н. Мосолова. — СПб.: Медицинское информационное агенство, 1994. — С. 317—325
13. Boivie J. Central pain / Wall P.D., Melzack R. (eds). Textbook of pain. — 3rd ed. — New York: Churchill Livingstone, 1994. — P. 871—902.
- 14.Coderre T.J., Katz J., Vaccarino A.L., Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence // Pain. — 1993. — Vol. 52. — P. 259—285.
15. Dickenson A.H., Besson J.-M. Pharmacology of pain: Handbook of experimental pharmacology. Vol. 120. — Berlin: Springer-Verlag, 1997.
16. Fundytus M.E., Fisher K., Dray A., Henry J.L., Coderre T.J. In vivo antinociceptive activity of anti-rat mGluR1 and mGluR5 antibodies in rats // Neuroreport. — 1998. — Vol. 9. — P. 731—735.
17. Wilcox G.L. Pharmacology of pain and analgesia // Pain. — 1999. — an updated review / Ed. M. Max. — Seattle: IASP Press, 1999. — P. 573—591.
18. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals // Pain. — 1983. — Vol. 16. — P. 109—110.

The role of antibodies to GABA and glutamate in pathogenesis of neuropathic pain syndrome

**Igonkina S.I., Grafova V.N., Smirnova V.S.,
Vetrile L.A., Zaharova I.A., Evseev V.A., Kukushkin M.L.**

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

The role of the antibodies to inhibitory neurotransmitter GABA and to excitatory neurotransmitter glutamate in pathogenesis of neuropathic pain syndrome on models of neuropathic pain syndrome was studied. It was shown that the development of experimental neuropathic pain syndrome is accompanied with induction of autoantibodies to glutamate and GABA. It was established that the antibodies to inhibitory neurotransmitter GABA have a pronociceptive effect and the antibodies to excitatory neurotransmitter glutamate have an antinociceptive effect.

Key words: *antibodies to GABA, antibodies to glutamate, neuropathic pain syndrome, spontaneous pain paroxysms, allodynia*