

Метаболический пул пуриновых соединений и содержание молибдена в спинномозговой жидкости при боковом амиотрофическом склерозе

Ю.В.Тихонов¹, Р.Р.Биктимеров¹, Р.Т.Тогузов¹, А.Ю.Волков¹,
С.Н.Савенков¹, К.В.Соколов², В.Н.Федоров², В.И.Скворцова²

¹Российский государственный медицинский университет,
кафедра клинической лабораторной диагностики ФУВ, Москва
(зав. кафедрой – проф. Р.Т.Тогузов);

²Российский государственный медицинский университет,
кафедра фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии, Москва
(зав. кафедрой – чл.-кор. РАМН, проф. В.И.Скворцова)

Проведено исследование изменений пуриновых соединений в спинномозговой жидкости пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС). Показаны выраженные сдвиги метаболизма пуринов. Активация катаболизма пуринов приводит к накоплению их конечных продуктов: гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты. Возрастание среднего значения Mo^{2+} в ликворе у пациентов с БАС хорошо коррелировало с увеличением уровня мочевой кислоты, что косвенным образом подтверждало резкое увеличение активности ксантиноксидазы в структурах мозга при развитии исследуемой патологии. Обсуждается прогностическое значение определений катаболитов пуринов.

Ключевые слова: пурины, спинномозговая жидкость, молибден, мочевая кислота

Metabolic pool of purine compounds and level of Mo^{2+} in cerebrospinal fluid at lateral amyotrophic sclerosis

Yu.V.Tikhonov¹, R.R.Biktimirov¹, R.T.Toguzov¹, A.Yu.Volkov¹,
S.N.Savenkov¹, K.V.Sokolov², V.N.Fedorov², V.I.Skvortsova²

¹Russian State Medical University, Educational Scientific Complex of Laboratory Diagnostics, Moscow
(Head of the Complex – Prof. R.T.Toguzov);

²Russian State Medical University, Department of Fundamental and Clinical Neurology and Neurosurgery, Moscow
(Head of the Department – Cor. Member of RAMS, Prof. V.I.Skvortsova)

It was carried out investigation of purines compound changes in spinal liquid of patients with lateral amyotrophic sclerosis (BAS). The expressed shifts of purines metabolism are shown. Activation of purines catabolism leads to accumulation of their end-products: hypoxanthine, xanthine and a uric acid. Increase of average Mo^{2+} value in cerebrospinal fluids in patients with the BAS well correlated with the increase in the level of a uric acid, that with indirect image confirmed sharp increase in activity of xanthine oxidase in structures of a brain at development of an investigated pathology. Prognostic value of purine catabolites definitions is discussed.

Key words: purine, cerebrospinal fluid, Mo^{2+} , uric acid

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является фатальным прогрессирующим заболеванием, приводящим к гибели мотонейронов коры головного мозга, ядер стволовых и спинномозговых отделов, а также к дегенера-

ции нисходящих двигательных проводящих путей [1]. В настоящее время в поражении центральных и периферических мотонейронов, формировании спастических и атрофических парезов трудно выделить патогенетические звенья, отвечающие за возникновение и развитие заболевания, будь это семейная или спорадическая формы БАС, поэтому вопросы его этиологии и патогенеза остаются открытыми [2, 3]. В любом случае реализация механизмов центральных двигательных нарушений должна быть связана с нарушениями на клеточном уровне, в частности, с церебральным метаболизмом различных биологически активных соединений [4, 5]. Ре-

Для корреспонденции:

Тихонов Юрий Владимирович, доктор биологических наук,
главный научный сотрудник ПНИЛ нуклеинового и белкового обмена
Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-6134
E-mail: dukhan@yandex.ru

Статья поступила 24.04.2008 г., принята к печати 25.02.2009 г.

зультаты транскраниальной магнитной стимуляции дают основания полагать, что при БАС корковые мотонейроны поражаются на ранних этапах болезни, а вовлечение в процесс их аксонов, т.е. пирамидного тракта, происходит позже [6].

Пуриновые соединения и их производные выполняют в клетке множество функций, затрагивающих практически все стороны пластического и энергетического обмена. Имеются прямые указания на связь клеточных функций мозга с концентрацией пуриновых и пиримидиновых метаболитов в спинномозговой жидкости (СМЖ) [7]. Кроме того, некоторые из этих соединений оказывают прямое физиологическое влияние на тканевом уровне, как, например, аденозин, обладающий свойством вазодилатации и эндогенного антиконвульсанта [8, 9].

Одной из существенных проблем изучения метаболизма пуринов в нервной ткани является вопрос локализации ферментов и, соответственно, специфичность их действия в разных типах клеток (нейроны, астроглии, олигодендроглии, микроглии и эндотелий сосудистой стенки). Кроме того, необходимо учитывать соотношение ферментативной активности *de novo* и *salvage* путей биосинтеза нуклеотидов, а также их катаболизма, поскольку вопрос тканеспецифичности обмена всегда актуален [10], а в нервной ткани может зависеть не только от типа клеток, входящих в её состав (нейроны или глиальные элементы), но и от всё той же локализации реакций в разных отделах мозга и интенсивности протекающих в нём процессов. В литературе описаны состояния и синдромы, устанавливающие связь между дефицитом ферментов пуринового обмена (трансфераз и дезаминаз) и неврологической симптоматикой. И хотя механизмы этих расстройств остаются загадкой, они, безусловно, указывают на чрезвычайно важный характер активности *salvage* ферментов метаболизма пуринов в нервной ткани.

Необходимо также учитывать, что активность многих ферментов связана с эндотелиальными клетками сосудов мозга, что может играть особую роль в функционировании гематоэнцефалического барьера и, тем самым, оказывать прямое влияние на протекание биохимических процессов в тканевых структурах мозга [11].

СМЖ является относительно изолированной средой организма, и наличие гематоэнцефалического барьера позволяет проводить оценку сдвигов церебрального метаболизма, касающихся продуктов и субстратов ферментативных реакций пуринового ряда при развитии патологического процесса.

Цель нашего исследования – выявление изменений в метаболическом пуле пуриновых соединений и определение содержания молибдена в СМЖ пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.

Материалы и методы

Определение молибдена в СМЖ методом атомной абсорбции. Определение Mo^{2+} проводилось на атомно-абсорбционном спектрофотометре (ААС) AA-6650 фирмы Shimadzu (Япония) и состояло из нескольких этапов: пробоподготовки, приготовления стандартных растворов, калибровки и измерения.

Пробоподготовка осуществлялась методом «мокрого» озоления в автоклаве с СВЧ нагревом. В тefлоновый авто-

клав было помещено 0,5 мл исследуемого образца СМЖ. Добавлены 1 мл HNO_3 (осч) и 0,5 мл H_2O_2 (30%, хч). Автоклав устанавливался в СВЧ систему, аналогичную системе фирмы «СЕМ» (США).

Параметры разложения: мощность 300 Вт; 1-й этап: 3 мин нагрева, 2 мин охлаждения; 2-й этап: 3 мин нагрева, 2 мин охлаждения; 3-й этап: 2 мин нагрева, охлаждение до 40–45°C.

Рабочие стандартные растворы готовились методом разбавления стандартного опорного раствора молибдена концентрацией 1000 ppm («Мерк») и доводились до требуемого объема бидистиллированной водой. Концентрация Mo^{2+} в рабочих калибровочных растворах составила: 0,01; 0,05; 0,1 ppm.

Калибровка выполнялась непосредственно перед каждой серией измерений после прогрева аппаратуры и лампы с полым катодом до рабочих параметров. Используемая резонансная линия Mo^{2+} – 313,3 нм, ширина щели – 0,2 нм, объем рабочего автодозатора – 15 мкл. Значения концентраций Mo^{2+} в калибровочных растворах были введены в программу калибровки компьютера. После проведения измерений и определения калибровочных точек программа обработки построила аппроксимированную калибровочную линию.

Перед измерениями готовился «холостой» раствор следующего состава: 0,5 мл H_2O_2 + 1,0 мл HNO_3 + 0,5 мл H_2O_2 (30%, хч). Сначала проводилось измерение «холостого» раствора и значение содержания Mo^{2+} в нем вводилось в программу обработки результатов измерений для последующего вычитания из результатов измерений. Непосредственно измерения содержания Mo^{2+} в исследуемых образцах проводились при тех же установленных параметрах длины волны, ширины щели, объема рабочего автодозатора и рекомендованных фирмой-изготовителем параметрах лампы. Печь – стандартная с пиролитическим покрытием. Нагревалась печь многоступенчато в течение 60 с при: 250°C, 1000°C, 2600°C, 2750°C. Осуществлялось по три измерения каждого образца с последующим вычислением среднего значения.

Определение пуриновых соединений в СМЖ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Работу проводили на хроматографической системе «Shimadzu» (Япония), включающей в себя:

- спектрофотометрический детектор «Shimadzu SPD-10Avp» с объемом ячейки 8 мкл и длиной оптического пути 10 мм,
- системный контроллер «Shimadzu SCL-10Avp»,
- два модуля подачи растворителя «Shimadzu LC-10ADvp»,
- программное обеспечение Shimadzu CLASS-VP™ Chromatography Data System Version 6.1 для анализа и идентификации хроматографических пиков.

Хроматографическое разделение проводили при комнатной температуре (20°C) на колонке (4,6 × 250 мм) «Altex» (Ultrasphere ODS, 5 мкм) с использованием предколонки «Guard-Pak» (μ -Bondapak C_{18}) при длине волны детектора 254 нм.

В качестве элюента использовалась трехкомпонентная смесь (60 mM KH_2PO_4 (Prolabo, Франция); 1 mM тетрабутиламмония фосфат (Sigma-Aldrich), 2,5% ацетонитрила (ОСЧ, УФ-210, ТУ 6–09–14–2167–84)), доведенная до pH 5,09 1 M KOH или 1 M H_3PO_4 (Prolabo, Франция).

Объемная скорость элюирования составляла 0,8 мл/мин. В качестве стандартов использовали калибровочные растворы смесей предшественников нуклеиновых кислот в концентрациях 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 нг/мл (Sigma, США).

Получение кислоторастворимой фракции СМЖ. Люмбальная пункция осуществлялась по стандартной методике в асептических условиях под местной анестезией 2–3 мл 0,5% раствора новокаина. Забор проб проводился в количестве 2 мл. Для получения нормативных показателей (контрольная группа) исследована спинномозговая жидкость у 21 пациента без патологии нервной системы, у которых были взяты образцы СМЖ во время спинномозговой анестезии по поводу плановых хирургических вмешательств; 22 испытуемых образца СМЖ были взяты у пациентов, страдающих болезнью двигательного нейрона (при дифференциальной диагностике болезни двигательного нейрона с инфекционными заболеваниями). Каждый образец после соответствующей маркировки хранился в морозильной камере при -40°C .

Наиболее распространенным и удобным способом извлечения кислоторастворимых продуктов из биологических жидкостей является метод экстракции хлорной кислотой с последующим осаждением хлората калия раствором КОН [12], причем концентрация, объем и кратность обработки кислотой варьируют у разных авторов в широких пределах.

Полученные в ходе люмбальной пункции образцы СМЖ обрабатывались 1 N HClO_4 (в соотношении СМЖ/хлорная кислота – 1:1). Полученный раствор нейтрализовали 1 M раствором КОН (Lachema) до pH 6,5–7,0. Коротким центрифугированием отделяли KCl (5 мин, 6000 об/мин), и полученный супернатант хранили в морозильной камере до проведения анализа при -40°C .

Результаты исследования и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные проведенного хроматографического анализа методом обращеннофазной ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Следует выделить многократное снижение уровня аденозинмонофосфата (AMP) в СМЖ при БАС, которое, строго говоря, может быть обусловлено активацией либо киназных реакций, либо реакций катаболизма аденилатов. Одновременно концентрация гуанозинмонофосфата (GMP) в СМЖ при этом заболевании также достоверно снижается, но концентрация инозинмонофосфата (IMP) достоверно возрастает. Среди конечных продуктов катаболизма пуринов обращает на себя внимание увеличение в СМЖ почти на порядок концентрации ксантина и мочевой кислоты – продуктов актив-

ности ксантиноксидазы, кислородзависимого Fe^{2+} и Mo^{2+} -содержащего фермента деградации пуринов. Этот факт может быть однозначно истолкован в пользу катаболизма пуринов в церебральных структурах. Путь распада аденилатов и гуанилатов до мочевой кислоты может протекать различными путями. Представляется важным понять эти особенности функционирования ферментных систем в нервной ткани. Например, катаболизм аденилатов в тканях может быть связан с повышением активности двух ферментов: 5'-нуклеотидазы или АМР-дезаминазы (GMP подвержен только дефосфорилированию). Содержание пуриновых нуклеозидов и их оснований в СМЖ при БАС свидетельствует в пользу второго (т.е. АМР-дезаминазы), поскольку два возможных продукта этих двух реакций – аденозин и IMP – ведут себя разнонаправленно: уровень аденозина падает, а IMP достоверно повышается, что свидетельствует в пользу повышения АМР-дезаминазной активности. В то же время инозин, являющийся продуктом активности либо аденозиндезаминазы (АДА), либо 5'-нуклеотидазы (дефосфорилирование IMP), не регистрируется в составе СМЖ пациентов с БАС. Учитывая значительное повышение концентрации гипоксантина и ксантина в составе СМЖ при данной патологии, логично допустить активацию пуриннуклеозидфосфорилазы и ксантиноксидазы, приводящую к следовым значениям инозина в ликворе.

Таким образом, ярко выраженный сдвиг метаболизма пуриновых соединений в мозговых структурах, приводящий к накоплению продуктов деградации пуринов и мочевой кислоты в спинномозговой жидкости при БАС, отражает перестройку ферментных систем их обмена, затрагивающую прежде всего активность таких ферментов, как АМР-дезаминаза, аденозиндезаминаза, пуриннуклеозидфосфорилаза и ксантиноксидаза. Конечно, остаются открытыми многие вопросы, связанные с типом продуцирующих клеток, распределением и специфичностью ферментативной активности, а также межклеточного и мембранного транспорта пуриновых метаболитов. Учитывая физиологическую активность многих пуринов, например, аденозина как вазодилатора и эндогенного антиконвульсанта, подобная перестройка их ферментных систем может отражать развитие патологического процесса в нервной ткани.

Например, активность АДА была зарегистрирована в олигодендроглии и эндотелиальных клетках сосудов головного мозга, что, по мнению авторов [13], может контролировать концентрацию внеклеточного аденозина в головном мозге. В одном из исследований было показано, что высокая активность АДА в СМЖ отмечается при туберкулезном менингите, а также лимфоме с менингеальными проявлениями [14]. Также имеется ряд работ, в которых указывается, что пуриннуклеозидфосфорилаза является основным ферментом, ответственным за превращение нуклеозидов в мочевую кислоту.

Вопрос о продукции мочевой кислоты является одним из актуальных вопросов церебрального метаболизма, поскольку в опубликованных работах активно обсуждается роль мочевой кислоты как соединения, обладающего, с одной стороны, антиоксидантной активностью, а также являющегося фактором защиты против оксидативного стресса [15], но с другой стороны, было показано, что ксантиноксидаза явля-

Таблица 1. Содержание пуриновых метаболитов (нг/мл) в СМЖ при БАС

Наименование метаболитов	Группа сравнения (n = 21), $\mu \pm \sigma$	БАС (n = 22), $\mu \pm \sigma$
Мочевая кислота	0,154 $\pm$ 0,015, $p < 0,001$	0,681 $\pm$ 0,098, $p < 0,001$
Гипоксантин	0,278 $\pm$ 0,072	2,375 $\pm$ 0,073, $p < 0,001$
Ксантин	1,604 $\pm$ 0,082, $p < 0,001$	9,273 $\pm$ 1,442, $p < 0,001$
Аденозин	0,597 $\pm$ 0,124, $p < 0,005$	0,127 $\pm$ 0,032, $p < 0,005$
Инозин	0,372 $\pm$ 0,172	0,000
ГМФ	0,718 $\pm$ 0,023, $p < 0,005$	0,255 $\pm$ 0,091, $p < 0,005$
ИМФ	1,587 $\pm$ 0,153	1,978 $\pm$ 0,82
АМФ	15,796 $\pm$ 1,352, $p < 0,001$	0,100 $\pm$ 0,002, $p < 0,001$

μ – среднее значение, σ – квадратичное отклонение.

Таблица 2. Содержание молибдена в СМЖ при БАС (n = 5)

Контроль, мг/л	БАС, мг/л
0,0126	0,078
0,023	0,069
0,018	0,077
0,0168	0,072
0,0182	0,0636
$\mu = 0,01772$;	$\mu = 0,0718$;
$\sigma = 0,0055$	$\sigma = 0,00151$
μ – среднее значение, σ – квадратичное отклонение.	

ется мощным фактором риска развития инфаркта миокарда и ишемического инсульта [16, 17]. Эти обсуждения касаются концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови; вопросы ее уровней в СМЖ остаются открытыми.

По нашим данным, уровень мочевой кислоты в СМЖ пациентов с БАС увеличивался с 0,15 до 0,68 нг/мкл. Поскольку кофактором у кислородзависимой ксантинооксидазы является Mo^{2+} , представлялось важным оценить его концентрацию в СМЖ у пациентов с БАС (табл. 2). Возрастание среднего значения Mo^{2+} в СМЖ у пациентов с БАС хорошо коррелировало с увеличением уровня мочевой кислоты, что косвенным образом подтверждало резкое увеличение активности ксантинооксидазы в структурах мозга при развитии исследуемой патологии. В настоящее время трудно предложить потенциальные биологические механизмы, объясняющие повышенные концентрации мочевой кислоты в СМЖ при БАС и, соответственно, выполняемые ею при этом функции, но прогностическое значение ее определений может стать предметом дальнейших исследований.

Литература

- Скворцова В.И., Лимборская С.А., Сломинский П.А., Левицкая Н.И., Левицкий Г.Н., Шадрин М.И., Кондратьева Е.А. Спорадический боковой амиотрофический склероз у пациентов с Asp90Ala мутацией медь-цинксодержащей супероксиддисмутазы в России // Журн. неврол. и психиатр. – 2000. – №1. – С. 44–47.
- Завалишин И.А. Рассеянный склероз и боковой амиотрофический склероз: развитие представлений об этиологии и патогенезе // Журн. неврол. и психиатр. – 1996. – Т.96. – №1. – С.24–28.
- Скворцова В.И., Соколов К.В., Лимборская С.А., Левицкий Г.Н. Молекулярные механизмы развития болезни двигательного нейрона // Журн. неврол. и психиатр. – 2005. – №4. – С. 68–76.
- Бунина Т.Л., Хондариан О.А., Коршунова Т.С. Лечение бокового амиотрофического склероза рибонуклеотидами // Журн. неврол. и психиатр. – 1976. – Т. 76. – №2. – С. 166–174.
- Хондариан О.А. К этиологии бокового амиотрофического склероза // Журн. неврол. и психиатр. – 1971. – Т.71. – №2. – С.161–163.
- Айрапетян К.В., Завалишин И.А., Никитин С.С. и Бархатова В.П. Патологические и патохимические механизмы центральных двигательных нарушений при боковом амиотрофическом склерозе // Журн. неврол. и психиатр. – 2000. – №7. – С. 38–42.
- Os V.S., De Abrey R., Hopman J., Wethly K., Liem D., Van De Bor M. Purine and Pyrimidine Metabolism and Electroencephalographic Brain Activity during Hypoxemia in Near-Term Lambs // Pediatric Research. – 2004. – V.55. – P. 1018–1025.
- George Hsiao, Kuang H. Lin, Yi Chang et al. Protective Mechanisms of Inosine in Platelet Activation and Cerebral Ischemic Damage // J. Clin. Pathol. – 1983. – V. 36. – P. 1–8.
- Coney A.M., Marshall J.M. Role of adenosine and its receptors in the vasodilation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia // The Journal of Physiology. – 1998. – V.509. – №2. – P. 507–518.
- Toguzov R.T., Tikhonov Yu.V. Diagnostic potential of HPLC: experimental and clinical trials // Purin and Pyrimidin Metabolism in Man VII, Part B. – N-Y., 1991. – P.21–26.
- Pardridge W.M., Yoshikawa T. Blood-brain barrier transport and brain metabolism of adenosine and adenosine analogs // AJP – Heart and Circulatory Physiology. – 1980. – V. 239. – P. – 2212–2221.
- Riss T.L., Zorich N.L., Williams M.D., Richardson A. Comparison of the efficiency of nucleotide extraction by several procedures and the analyses of nucleotides from extracts of liver and isolated hepatocytes by HPLC // J. Liquid Chromatogr. – 1980. – V. 3. – P. 133 – 158.
- Parkinson F.E., Xiong W., Zamzow C. Astrocytes and neurons: different roles in regulating adenosine levels // Neurol. Res. – 2005. – V. 27. – P. 153–160.
- Mishra O.P., Loiwal V., Nath Z.Ali. G., Chandra L. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity for the diagnosis of tuberculous meningitis in children // J. Trop. Pediatr. – 1996. – V. 42. – P.129–132.
- Yu Z.F., Bruce-Keller A.J., Goodman Y., Mattson M.P. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture and against focal ischemic brain injury in vivo // J. Neurosci. Res. – 1998. – V. 53. – P. 613–625.
- Kanellis J., Johnson R.J. Elevated uric acid and ischemic stroke: accumulating evidence that it is injurious and not neuroprotective // Stroke. – 2003. – V. 34. – P. 1956–1957.
- Michiel J. Bos, Peter J. Koudstaal, Albert Hofman et al. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke // Stroke. – 2006. – V. 37. – P. 1503–1506.

Информация об авторах:

Биктимеров Ренат Рафаилович, аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики ФУВ Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 676-7961
E-mail: uracil@yandex.ru

Тогузов Руслан Тимофеевич, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-5523
E-mail: kld@rsmu.ru

Волков Андрей Юрьевич, старший научный сотрудник кафедры клинической лабораторной диагностики ФУВ Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-0727
E-mail: microbalance@mail.ru

Савенков Сергей Николаевич, младший научный сотрудник кафедры клинической лабораторной диагностики ФУВ Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-0727
E-mail: savenkov@yandex.ru

Соколов Константин Владимирович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 471-3720

Федоров Владимир Николаевич, врач-невролог НИИ инсульта Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-5523
E-mail: fedorovVN@rosminzdrav.ru

Скворцова Вероника Игоревна, член-корреспондент РАМН, профессор, директор НИИ инсульта Российского государственного медицинского университета, заведующая кафедрой фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 471-3720