

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.832-004.2-053.2-092.18

*И.Е.Смирнов, А.Г.Кучеренко, Н.Н. Шатилова, Л.М. Кузенкова***АПОПТОЗ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ У ДЕТЕЙ**

ФГБУ Научный центр здоровья детей РАМН, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2/62

*Представлены данные обследования 122 детей с рассеянным склерозом. Установлено повышение концентраций факторов и индукторов апоптоза в стадии обострения РС у детей с последующим снижением их содержания при его ремиссии. Изменения содержания изученных маркеров программируемой клеточной гибели у обследованных больных являются свидетельством того, что РС у детей является формой патологии, связанной с выраженным усилением апоптоза. Выявленные закономерности изменений сывороточных уровней факторов и индукторов апоптоза при РС позволяют использовать их в качестве дополнительных молекулярных маркеров активности течения РС и оценки эффективности проводимой терапии. Комплексное исследование неврологического и соматического статуса детей, страдающих РС, в сочетании с определением содержания в крови факторов и индукторов апоптоза дополняют диагностические критерии определения активности РС и могут быть рекомендованы к использованию в специализированных отделениях.*

*Ключевые слова:* рассеянный склероз у детей, факторы апоптоза, аннексин V, цитокины, оксид азота, диагностические критерии активности, лечение препаратами интерферона  $\beta$  1a

*I.E.Smirnov, A.G.Kucherenko, N.N. Shatilova, L.M. Kuzenkova*

## APOPTOSIS IN MULTIPLE SCLEROSIS IN CHILDREN

Federal State Budgetary Institution "Scientific Center of Child Healthcare" of the Russian Academy of Medical Sciences, 2/62, Lomonosov avenue, Moscow, 119991

*There are presented data of the investigation of 122 children with multiple sclerosis (MS). The concentration of factors and inducers of apoptosis has been established to increase in acute relapses of MS in children and to decrease during the remission of the disease. Changes in the content of studied markers of programmed cell death in the examined patients are the evidence that MS in children is a form of pathology associated with a marked increase in apoptosis. The investigation patterns of changes in serum levels of factors and inducers of apoptosis in MS permit to apply them as additional molecular markers of activity of MS course and assessment of the therapeutic efficacy. Complex study of neurological and somatic status of children with MS, in conjunction with the evaluation of factors and inducers of apoptosis in blood, fill up diagnostic criteria for estimation of the activity of MS and can be recommended for use in specialized clinical units.*

*Key words:* multiple sclerosis in children, factors of apoptosis, Annexin V, cytokines, nitric oxide, the diagnostic criteria of activity, treatment with interferon beta -1a preparations

Принято считать, что рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее иммуноопосредованное заболевание с многоочаговым поражением ЦНС, протекающее с обострениями и ремиссиями или прогрессирующе у генетически предрасположенных лиц [1,2]. Однако выявление различных вариантов олигодендроглиопатии и аномальной ремиелинизации, а также доказательства повреждения аксонов и нейронов не только в активных очагах, но и во внешне неизменном белом веществе мозга сблизили РС с дегенеративными заболеваниями ЦНС [3,4]. В последние годы установ-

лено, что при РС происходит повреждение аксонов и нейронов, степень выраженности которого варьируется по интенсивности в различных очагах поражения у одного пациента, а также при сравнении очагов у разных больных РС [3,5]. Показано, что ключевым фактором патогенеза повреждений при РС является гибель нейронов, которая реализуется как программируемая гибель клетки (ПГК) (апоптоз) и патологическая клеточная смерть (некроз) [6,7].

В связи с этим особый интерес представляет исследование именно ПГК у детей, страдающих РС, так как выявление нарушений регуляции апоптоза при РС позволит определить возможные особенности течения заболевания и пути их коррекции. Учитывая, что поражение аксонов и нейронов при РС регистрируется уже со стадии дебюта и неуклонно прогрессирует в процессе заболевания, что обуслов-

**Для корреспонденции:** Смирнов Иван Евгеньевич, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. патофизиологии с блоком радионуклидных исследований НИИ педиатрии ФГБУ НИЦЗД РАМН, Москва, e-mail: smirnov@nczd.ru

ливаает постепенное накопление необратимого неврологического дефицита, становится ясной особая значимость точной диагностики степени поврежденной нервной ткани на разных этапах течения болезни и разработка нейропротективной терапии при РС у детей. Апоптоз определяется наличием генетически детерминированного аппарата самоуничтожения, основные факторы которого в норме конститутивно присутствуют в различных компартментах клетки и предназначены исключительно для исполнения программы клеточной смерти [8]. Эти компоненты находятся в латентном состоянии и могут быть приведены в действие в результате смещения баланса про- и антиапоптогенных сигналов. Одновременно со специализированными молекулярными системами реализации гибели клетки в процессах формирования, анализа и проведения к эффекторам сигнала апоптоза участвуют внутриклеточные регуляторы и мессенджеры, имеющие более широкие функции [9,10].

Установлено существование по меньшей мере двух различных путей индукции сигнала апоптоза: внеклеточного и внутриклеточного. При этом воспринятый соответствующим сенсором сигнал смерти становится инициатором каскада последовательных активаций ряда проапоптогенных факторов. Самостоятельность указанных сигнальных путей относительна, так как существуют многочисленные точки переключения сигнала, а на эффекторной стадии апоптоза различные пути конвертируют и используют общий суицидный механизм. Установлено, что на клеточной поверхности присутствуют специфические рецепторы "лигандов смерти", относящиеся к суперсемейству TNF-подобных рецепторов (TNFRSF — Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily), которое включает TNFR-1, TNFR-2, LTA-R, LTβ-R, APO-1, DR3, DR4, DR5, DR6, CD27, CD30, OX40, OPG и др. В настоящее время обнаружено более двадцати рецепторов этого семейства, и, вероятно, это количество не останется окончательным [8,9]. Наиболее распространенными среди клеток организма человека являются рецепторы CD95(Fas/APO-1), TNFR-1 и TNFR-2. Выявлено, что активированный рецептор взаимодействует с соответствующим внутриклеточным адаптером или адаптерами. Для рецептора CD95(Fas/APO-1) адаптером является FADD (от англ. Fas-associated DD-protein — "белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора"). Для рецепторов TNFR-1 и DR3 адаптером является TRADD (от англ. TNFR1-associated DD-protein — "белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR-1-рецептора").

Рецепторзависимый каспазный путь реализация апоптоза заключается в том, что после связывания с лигандом рецептор CD95(Fas/APO-1) подвергается тримеризации и рекрутирует белок FADD, что приводит к образованию надмолекулярного комплекса с прокаспазой-8 и ее активации; в свою очередь каспаза-8 активирует каспазу-3, являющуюся главной исполнительной ("экзекуторной") каспазой клетки.

Митохондриальный путь апоптоза начинается с коллапса мембранного потенциала митохондрий и сопровождается высвобождением цитохрома С из

межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки. В качестве альтернативного пути выхода апоптогенных белков из митохондрий рассматривается вариант образования белковых каналов во внешней митохондриальной мембране, которые открывают белки семейства Bcl 2. При этом в цитоплазму высвобождаются: цитохром С — белок с мол. массой 15 кД; прокаспазы 2, 3 и 9; AIF (от англ. apoptosis inducing factor — фактор, индуцирующий апоптоз) — флавопротеин с мол. массой 57 кД. Цитохром С вместе с белком apaf-1 (от англ. apoptosis protease activating factor-1 — фактор активации протеаз апоптоза) и другими индуцирующими апоптоз факторами, АТФ и прокаспазы-9 формируют в цитоплазме клетки апоптосому, в которой посредством автокатализа активируется каспаза-9, в свою очередь активирующая центральную каспазу-3, запускающую процесс разрушения ДНК и цитоскелета клетки ДНКазами и другими каспазами. Показано, что реакция клетки на одни и те же индуцирующие апоптоз факторы в значительной мере зависит от ее функционального состояния, а также от действия ряда других факторов, составляющих в совокупности "клеточный контекст" [7-9].

За последние годы опубликовано большое количество обзоров, освещающих различные стороны ПГК, накоплен фактический материал, касающийся триггеров и элементов регулирования этого процесса [2,3,6,10]. В частности, активно исследуются еще по крайней мере три типа проапоптогенных сигнальных каскадов: эффекты экзо- и эндогенных церамидов; апоптогенный сигнал, обусловленный повреждением мембран эндоплазматического ретикула и связанной с этим событием трансактивацией иницирующей каспазы-12; апоптогенные стимулы, связанные с гормональной рецепцией или, напротив, с ее отсутствием в гормонозависимых тканях [4,8,9]. Одновременно показано, что в целом антиапоптогенным влиянием обладают разветвленные каскады митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), фосфоинозитол-3-киназа (PI3K) и многие серин-, тирозин- и треонинпротеинкиназы [6]. Хотя протеинкиназы могут в определенных условиях участвовать в формировании проапоптогенных стимулов, общий баланс их активности смещен в сторону поддержания программы выживания и пролиферации, с чем связывают перспективу их регуляции для лечения некоторых форм патологии нервной системы, обусловленных атрофией нервной ткани в результате апоптоза (боковой амиотрофической склероз, болезнь Альцгеймера, спинальная мышечная атрофия и др) [2, 4, 5].

Изучение различных аспектов РС по-прежнему остается актуальной проблемой, медицинская и социальная значимость которой обусловлена нарастающей заболеваемостью лиц молодого возраста, возможностью быстрого развития стойкой инвалидизации при недостаточной эффективности имеющихся терапевтических средств [1, 5, 11].

В последние годы дебют РС все чаще отмечается у детей до 16 лет. Установлено, что клинические проявления заболевания в детском возрасте могут

последовать за вирусной инфекцией или иммунной стимуляцией. При этом повреждения нервной ткани при РС включают иммуновоспалительную демиелинизацию с олигодендропатией и постепенно нарастающую нейродегенерацию [1,3,5,12]. Эти явления связывают с нарушениями проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и активным проникновением в ткань мозга Т-лимфоцитов, сенсibilизированных к антигенам миеллина. Под действием ряда факторов Т-лимфоциты активируются, пролиферируют и включают эффекторные реакции, повреждающие миелин и аксоны. В результате активации Т-лимфоциты (CD4+) становятся аутоагрессивными [10,13]. Затем происходит набухание Т-клеток и прикрепление их к эндотелиальным клеткам сосудов с последующей инфильтрацией сосудистой стенки и секрецией матриксных металлопротеиназ (ММП), ускоряющих проникновение Т-лимфоцитов через ГЭБ. Проникнув в ЦНС, Т-клетки, уже активированные по отношению к аутоантигену, взаимодействуют с антигенпрезентирующими дендритными клетками, а также с периваскулярными макрофагами и микроглией. Эти активированные клетки продуцируют провоспалительные цитокины: интерферон- $\gamma$  (ИФН $\gamma$ ), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), ИЛ-2 и др. Аутоантигенами в ЦНС являются белки миеллина: основной белок миелина, протеолипидный белок, миелинолигодендротарный гликопротеин. В результате нарастающей активации прогрессируют демиелинизация и гибель олигодендроцитов, усиливаются глиотоксические повреждения, происходит накопление свободнорадикальных соединений и медиаторов воспаления [13,14].

В связи с этим, несомненно, значимым является поиск молекулярных биомаркеров, способных дополнить традиционное неврологическое и МРТ-исследование больных РС. Для определения значимости таких биомаркеров нужно учитывать, что ведущим фактором, повреждающим ГЭБ, является нарушение баланса между синтезом и разрушением белков внеклеточного матрикса (ВКМ), определяющее темпы патологического ремоделирования ГЭБ, которое происходит на фоне формирования воспаления и прогрессирования нейродегенерации и тканевой деструкции. Недавно появились публикации, посвященные выявлению определенных изменений уровней ММП в периферической крови при различных формах РС у детей [10,14,15]. Наряду с этим выявление маркеров апоптоза (sFas-R, sFas-L, цитохром С, аннексин V) и его регуляторов – ФНО $\alpha$  и оксида азота (NO) в процессе формирования РС у детей представляется особенно актуальным, учитывая пластичность нервной системы растущего организма. Однако изменения содержания в крови этих факторов и их роль в активации апоптоза у детей, страдающих РС, еще недостаточно исследованы, что определило цель нашей работы.

Проведение работы было одобрено локальным этическим комитетом. На проведение всех необходимых исследований и гарантированное лечение было получено добровольное информированное согласие.

## Материалы и методы

Под наблюдением находились 134 ребенка в возрасте от 10 до 18 лет, средний возраст  $15,7 \pm 1,4$  года. Все дети были комплексно обследованы с использованием современных клинических, инструментальных и лабораторных методов. Из них у 122 детей был диагностирован РС, при этом были использованы критерии МакДональда 2011 г. пересмотра для постановки диагноза достоверного РС. Дети с первично и вторично прогрессирующим РС, которые имели выраженный стойкий неврологический дефицит, в исследование не включались. Все дети, страдающие РС, были распределены на 3 группы. 1-ю составили 64 больных в стадии обострения РС, которое клинически проявлялось наличием транзиторного неврологического дефицита в виде сенсорных, двигательных, координаторных, офтальмологических нарушений, а также нарушений функций тазовых органов и психики. При нейровизуализации с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) у них определялись контрастопозитивные очаги как с диффузным накоплением контрастного вещества, так и по типу кольца/полукольца, выявлялись также свежие очаги демиелинизации.

Во 2-ю группу вошли 45 детей с ремиссией заболевания после эффективного курса лечения препаратами интерферона бета 1а (ИФН- $\beta$  1а) (авонекс и ребиф) внутримышечно в соответствующих возрасту дозировках.

3-ю группу составили 13 больных с субклиническим обострением РС, у которых при отсутствии клинического неврологического дефицита на МРТ-томограммах определялись новые, нередко множественные очаги накопления контрастного вещества по типу кольца/полукольца, что свидетельствовало о прогрессировании РС.

Референтную группу составили 12 условно здоровых детей того же возраста.

У всех обследованных больных наличие очагов демиелинизации определялось методом МРТ головного мозга в режимах T-1W, T-2W и FLAIR в трех ортогональных проекциях - сагиттальной, коронарной и аксиальной до и после парамагнитного контрастного усиления путем внутривенного введения контрастного препарата (гадовист) в стандартной дозировке. Эти исследования были проведены на МРТ-томографе Signa HDX 1,5 T ("GE", США).

В связи с тем, что в настоящее время актуальна проблема адекватности методологий оценки активности нейродегенеративного процесса при РС [5] у всех обследованных детей в сыворотке крови мы определяли концентрации маркеров (Fas-лиганд, sAPO-1/Fas, цитохром С, аннексин V) и регуляторов апоптоза (ФНО $\alpha$ ) методом твердофазного энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA) с помощью специальных наборов реагентов ("Bender Medsystems"). Для определения в сыворотке крови суммарного содержания нитритов и нитратов, отражающих продукцию оксида азота (NO) использовали колориметрический микропланшетный метод. Подсчет оптической плотности в пробах осуществляли

на анализаторе иммуноферментных реакций АИФР-1 "Униплан" (Россия).

Все полученные данные были обработаны статистически с использованием пакета программ Statistica-6. Статистически значимыми считали уровни значимости различий при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что у больных детей с обострением течения РС была отмечена выраженная активация внешнего (рецепторзависимого) пути апоптоза, проявлявшаяся существенным увеличением концентраций в сыворотке крови Fas-рецептора (sAPO-1/Fas) в 12 раз и Fas-лиганда (Fas-L) в 2,5 раза по сравнению с их уровнями у детей референтной группы. При этом уровни цитохрома С и аннексина V увеличивались соответственно в 9 и 2 раза по сравнению с таковыми в референтной группе (рис. 1). Ранее было установлено, что выраженная экспрессия Fas-рецептора на клеточной мембране указывает на готовность клетки к апоптозу, однако для запуска процесса необходимо действие индукторов, в качестве которых могут выступать провоспалительные цитокины, в частности, ФНО $\alpha$  и NO [6]. Вместе с тем нами установлено, что в крови больных этой группы концентрации ФНО $\alpha$  и NO оказались повышенными соответственно в 2,7 и 3,4 раза по сравнению с референтной группой (рис.2). Эти данные свидетельствуют о том, что у детей при обострении РС происходит активация патохимических реакций с нарастающей продукцией факторов апоптоза, цитокинов и ММП. Ранее у этих же больных нами было установлено значительное (в 4,8 раза) увеличение сывороточного содержания ММП-9, ММП-3 и ММП-8 на фоне значимого снижения ММП-2 по сравнению с референтными уровнями. У этих же детей было выявлено увеличение (в 1,4 раза) концентраций ингибитора ТИМП-1 в крови [14]. Эти изменения уровней ММП способствуют активации апоптоза, что приводит к прогрессированию нейродегенерации, расширению повреждений ГЭБ, увеличению разрушений миелиновой оболочки и формированию новых очагов демиелинизации, что было установлено нами при МРТ-обследовании больных этой группы. При этом обращало на себя внимание наличие множественных очагов гиперинтенсивного МР-сигнала в режимах T2W и FLAIR с накоплением контрастного вещества по типу кольца/полукольца [2,4]. Следует отметить, что при обострении РС одним из харак-

терных признаков апоптоза является выход фосфатидилсерина (ФС) с внутренней поверхности мембран на поверхность клеток, претерпевающих апоптоз [9]. Эти молекулы ФС распознаются специальными рецепторами фагоцитов, после чего апоптотические клетки и/или их фрагменты удаляются из ткани. Распознавание и последующая элиминация клеток, подвергшихся апоптозу, осуществляется благодаря появлению на их поверхности специфических молекул кальцийзависимых фосфолипидсвязывающих белков – аннексинов. Одним из них является аннексин V, образующий комплекс с ФС и выносящий последний на поверхность биомембран. Аннексин V, известный также как плацентарный антикоагулянтный протеин (PAP-1), с высокой аффинностью связывается с экспонированным на поверхности апоптотических клеток ФС и ингибирует их прокоагулянтную и провоспалительную активность. Определение этого соединения в крови больных детей в стадии обострения РС выявило его увеличение более чем в 9 раз по сравнению с референтной группой (см. рис.1). Следующая фаза апоптоза обусловлена активацией каспазы-1 и является общей при многих способах его индукции. Каспаза-1 повышает проницаемость митохондриальной мембраны, что сопровождается выделением в цитоплазму целого ряда апоптотических факторов, в том числе цитохрома С, и влечет за собой активацию каскада каспаз и эндонуклеаз, и приводит к деградации ДНК. У больных РС в стадии обострения нами было отмечено повышение содержания в крови цитохрома С более чем в 2 раза по сравнению с контролем, что указывает на значимую активацию митохондриаль-

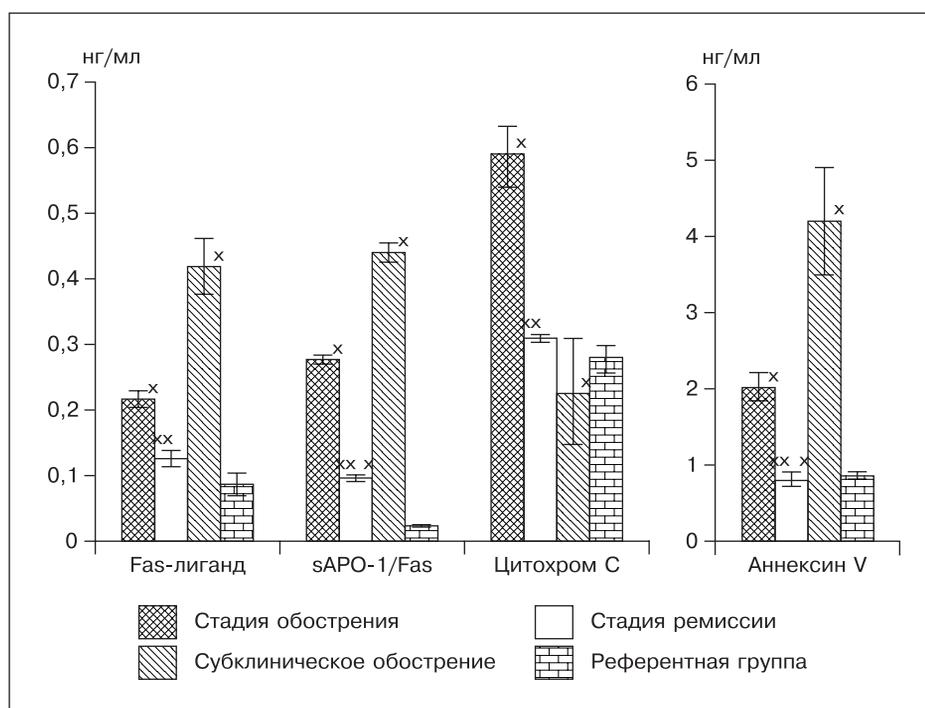


Рис. 1. Изменения содержания факторов апоптоза в сыворотке крови детей, страдающих РС, в зависимости от стадии течения заболевания ( $M \pm m$ ).

Здесь и в других рисунках звездочками обозначены уровни статистической значимости различий показателей: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с референтной группой; \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению со стадией обострения.

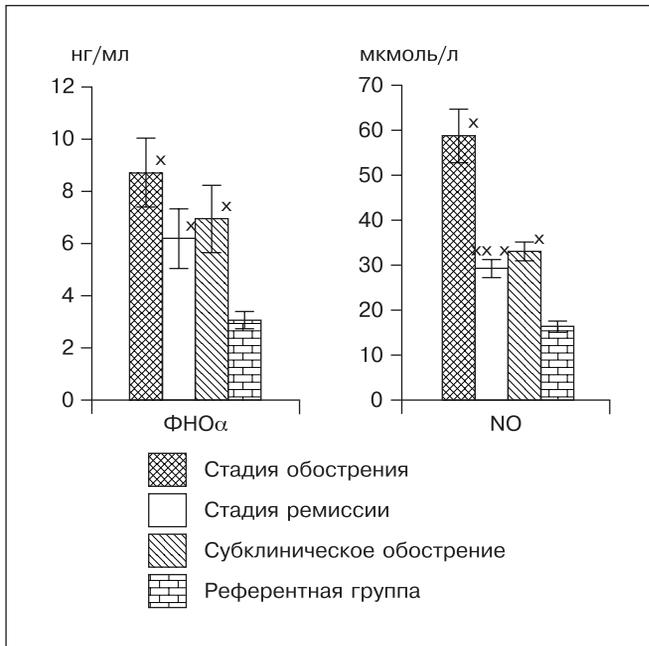


Рис.2. Изменения содержания ФНО $\alpha$  и NO в сыворотке крови больных детей с разными стадиями рассеянного склероза ( $M\pm m$ ).

ного пути апоптоза у этих больных (см. рис.1). Следовательно, установленные закономерности изменений содержания факторов апоптоза у больных РС свидетельствуют, что стадия обострения РС характеризуется активацией и мембранного, и митохондриального пути апоптоза на фоне выраженного увеличения концентраций в крови больных детей ФНО $\alpha$  и NO по сравнению с референтной группой.

У больных с ремиссией РС динамика содержания изученных нами факторов апоптоза характеризовалась уменьшением концентраций в сыворотке крови Fas-рецептора (sAPO-1/Fas) и Fas-лиганда (Fas-L) более чем в 2,5 раза по сравнению с их уровнями у больных РС детей в стадии обострения. При этом уровни аннексина V уменьшались в 2,6 раза, содержание цитохрома C существенно не отличалось от его концентраций у детей референтной группы (см. рис.1). Очевидно, что стадия ремиссии РС на фоне проводимой терапии препаратами ИФН $\beta$ -1a сопровождается статистически значимым уменьшением содержания в крови изученных нами маркеров апоптоза относительно острой стадии заболевания. Терапия ИФН $\beta$ -1a внутримышечно привела к

клинической стабилизации заболевания у этой группы больных. Однако сывороточное содержание sAPO-1/Fas и аннексина V, несмотря на их существенное снижение не достигало референтных уровней. Эти изменения свидетельствуют о положительном эффекте проводимой терапии препаратами группы ИФН $\beta$ , способствующими торможению активности патологического процесса. В то же время остающаяся высокая продукция ФНО $\alpha$  и NO в определенной мере может обуславливать постоянную активацию апоптоза поврежденных олигодендроцитов (о чем свидетельствуют повышенное содержание в крови Fas-рецептора и аннексина V) на стадии ремиссии заболевания. По-видимому, несмотря на уменьшение активности РС, препараты ИФН $\beta$ -1a не в состоянии существенно блокировать апоптоз у детей на фоне клинической ремиссии РС.

Вместе с тем нами установлено, что наиболее драматические нарушения апоптоза формируются у больных с субклиническим обострением РС (3-я группа). Сывороточные уровни изученных нами маркеров апоптоза оказались наиболее высокими, что свидетельствует о непосредственном участии апоптоза в формировании свежих очагов демиелинизации, регистрируемых при МРТ-исследовании на фоне благополучной клинической картины заболевания у этих детей (см. рис.1). Такое выраженное увеличение концентраций факторов апоптоза в сыворотке крови этих больных имеет существенное диагностическое и прогностическое значение, определяя необходимость постоянного нейровизуального контроля за состоянием этих больных и эффективностью противо-

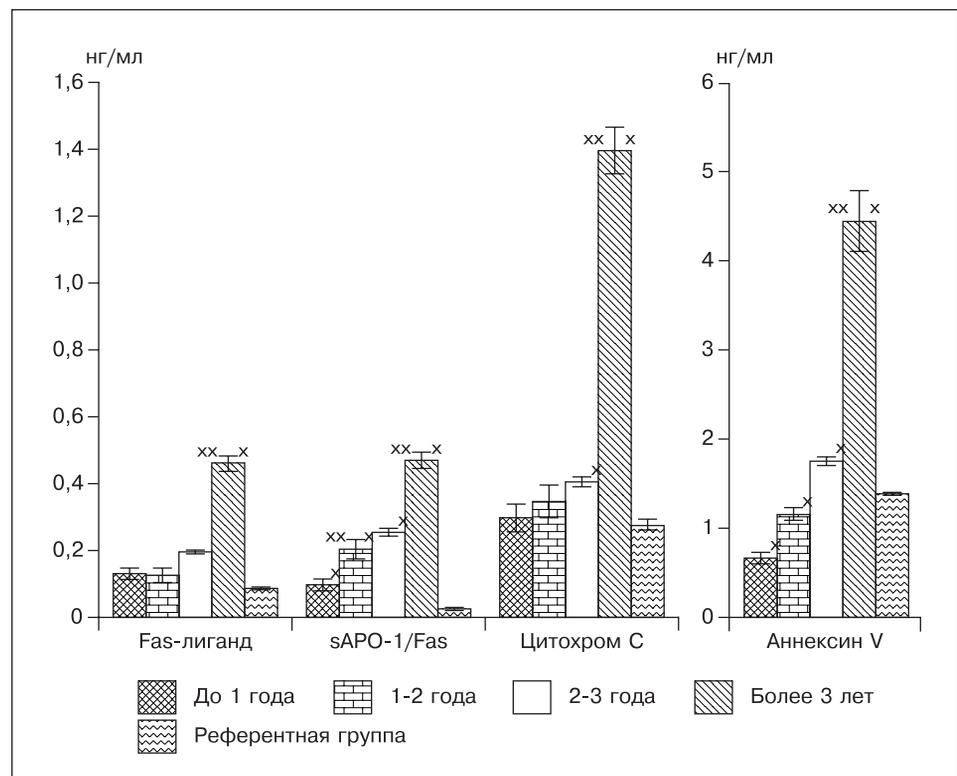


Рис.3. Изменения содержания факторов апоптоза в сыворотке крови детей, страдающих РС, в зависимости от длительности заболевания ( $M\pm m$ ).

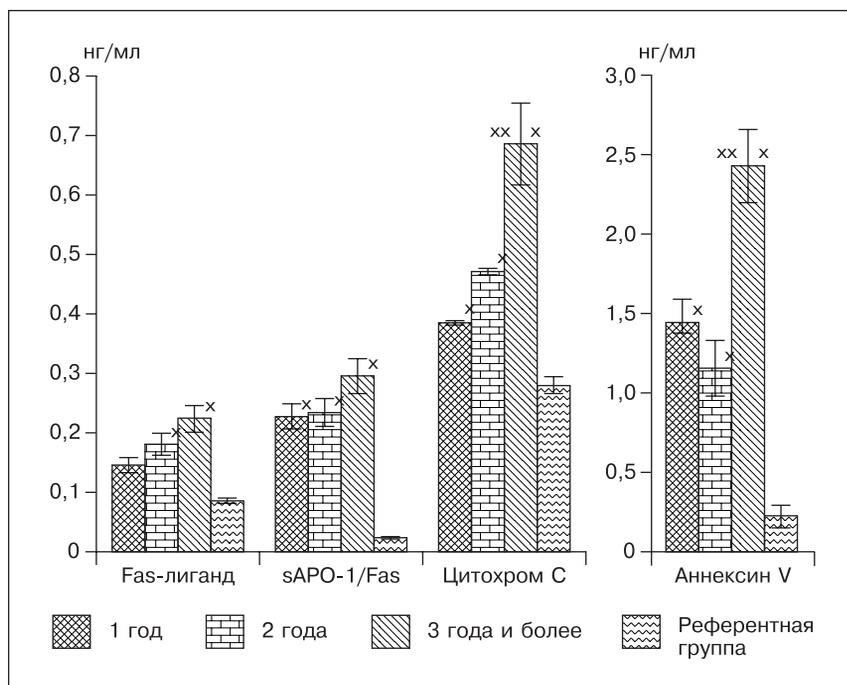


Рис.4. Изменения содержания факторов апоптоза в крови детей, страдающих РС, в зависимости от длительности лечения заболевания ( $M \pm m$ ).

апоптотической терапии на протяжении всего периода наблюдения.

Поскольку РС является хроническим, волнообразно текущим заболеванием, при котором периоды ремиссии сменяются периодами обострения, несомненный интерес представлял анализ динамики концентраций маркеров апоптоза в зависимости от длительности течения заболевания (см. рис. 3). При этом было выявлено, что патологические сдвиги регистрировались уже в первые месяцы болезни и персистировали по мере ее прогрессирования: у больных детей было установлено увеличение концентраций в крови sAPO-1/Fas и аннексина V соответственно в 4 и 2,9 раза по сравнению с референтной группой. При длительности заболевания более двух лет в крови больных выявлялись повышенные концентрации изученных нами маркеров апоптоза, что указывает на активацию обоих путей ПКГ, прогрессивно нарастающей по мере увеличения длительности болезни и максимально выраженной у детей, страдающих РС более трех лет, когда содержание в крови sAPO-1/Fas и аннексина V увеличивалось соответственно в 20 и 19 раз по сравнению с референтными уровнями. При этом концентрации Fas-лиганда и цитохрома С повышались более чем в 5 раз, уровни NO – более чем в 2 раза по сравнению с референтной группой (см. рис. 3).

На основании этих данных можно полагать, что изменения содержания изученных нами маркеров ПКГ у обследованных больных являются свидетельством того, что РС у детей является формой нейродегенеративной патологии, связанной с выраженной усилением апоптоза. Причем длительно проводимое лечение РС у детей существенно не изменяет установленные нами закономерности изменений содержания маркеров апоптоза в крови. Уже на ранних этапах

терапии (до 1 года), несмотря на клиническое улучшение, была отмечена активация обоих путей апоптоза, что дополнительно указывает на прогрессивно текущий, непрекращающийся процесс даже на фоне приема препаратов ИФНβ-1a, изменяющих течение заболевания (рис.4). Подтверждением этому может служить и повышение сыровоточных концентраций изученных маркеров апоптоза через 3 года и более от начала лечения. Возможно, что устойчивая стимуляция эффекторных клеток ФНОα, NO и другими индукторами апоптоза при ремиттирующем течении РС способствует активной демиелинизации и прогрессирующему поражению тканей.

Таким образом, несмотря на качественно новое направление патогенетической терапии РС у детей - внедрение препаратов ИФНβ-1a [15,16] и обусловленное этим уменьшение экспрессии различных хемокинов и ММП [14,17], проведенные нами исследования показали, что у детей, страдающих РС, на фоне лечения не происходит коррекции и оптимизации молекулярных механизмов апоптоза, так как изученные факторы апоптоза в крови больных не достигают референтных уровней. В связи с этим можно полагать, что генетически обусловленное усиление апоптоза является ведущим патогенетическим механизмом РС у детей. Вместе с тем нами не было отмечено уменьшения содержания индукторов ПКГ - ФНОα и NO в крови больных РС детей в стадии ремиссии, что также способствует активации апоптоза независимо от проводимой терапии.

Полученные нами данные свидетельствуют также, что особого внимания требуют больные дети с субклиническим обострением РС (3-я группа), у которых, несмотря на отсутствие признаков клинической активности болезни, при МРТ-исследовании определялись множественные свежие очаги демиелинизации. Ранее у этих детей нами было выявлено существенное увеличение соотношения ММП-9/ТИМП-1 в крови, указывающее на преобладание процессов разрушения ВКМ и способствующее нарастанию демиелинизации [14]. Эти данные указывают на то, что такие больные составляют группу риска, требуют тщательного наблюдения и использования для уменьшения активности течения РС модифицирующей терапии препаратами, изменяющими течение заболевания, или применения специализированных биологических агентов [18].

Важно отметить также, что неуклонное увеличение содержания факторов и индукторов апоптоза в сыровотке крови больных при обострении течения РС и их выраженное повышение в зависимости от стадии и длительности течения болезни позволяют использовать их в качестве дополнительных молекулярных маркеров степени активности РС у детей и оценки эффективности проводимой терапии. Ком-

плексное исследование неврологического и соматического статуса детей, страдающих РС, в сочетании с определением сывороточных уровней факторов и индукторов апоптоза в сыворотке крови существенно дополняют диагностические критерии определения активности РС и могут быть рекомендованы к использованию в специализированных отделениях для повышения эффективности лечебных и реабилитационных мероприятий. Очевидно, что имеющиеся трудности в оценке выраженности нейродегенерации при РС во многом объясняются отсутствием стандартизированных методик оценки данного процесса при РС, а также четкого представления о временных рамках, распространенности и механизмах нейродегенерации при РС [5]. В связи с этим проведенный нами анализ изменений содержания маркеров и индукторов апоптоза в сыворотке крови у детей с ремиттирующим течением РС представляется полезным методом оценки активности нейродегенеративного процесса наряду с современными способами нейровизуализации и протонной МР- спектроскопии [5,17].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Бойко А.Н., Столяров И.Д. Рассеянный склероз, справочник. М.: Реал Тайм, 2009.
2. Prineas J.W., Parratt J.D. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann. Neurol.* 2012; 72 (1):18-31.
3. Caprariello A.V., Mangla S., Miller R.H., Selkirk S.M. Apoptosis of oligodendrocytes in the central nervous system results in rapid focal demyelination. *Ann. Neurol.* 2012; 72 (3):395-405.
4. Mc Guire C., Beyaert R., van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* 2011; 34 (12): 619-28.
5. Давыдовская М.В., Бойко А.Н., Подопригора А.Е., Пронин И.Н., Корниенко В.Н., Гусев Е.И. Нейродегенеративный процесс при рассеянном склерозе и возможный нейропротективный эффект терапии β-интерфероном 1а (авонекс). Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. 2012; 112 (9): 129-35.
6. Raine C.S., Bonetti B., Cannella B. Multiple sclerosis: expression of molecules of the tumor necrosis factor ligand and receptor families in relationship to the demyelinated plaque. *Rev. Neurol (Paris).* 1998; 154 (8-9): 577-85.
7. Смирнов И.Е., Ровенская Ю.В., Зайниддинова Р.С., Кучеренко А.Г. Динамика факторов апоптоза при перинатальных поражениях центральной нервной системы у детей первого года жизни // Российский педиатрический журнал. 2011; 6: 4-8.
8. Блохин Д.Ю. Программированная гибель клеток: путь от индукции до исполнения. *Патогенез.* 2003; 2: 25-33.
9. Podbielska M., Krotkiewski H., Hogan E.L. Signaling and regulatory functions of bioactive sphingolipids as therapeutic targets in multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* 2012; 37(6):1154-69.
10. Holman D.W., Klein R.S., Ransohoff R.M. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1812 (2): 220-30.
11. Reichardt H.M., Lühder F. The ambivalent role of apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 2012; 18(29): 4453-64.
12. De Santi L., Polimeni G., Cuzzocrea S., Esposito E., Sessa E., Annunziata P., et al. Neuroinflammation and neuroprotection: an update on (future) neurotrophin-related strategies in multiple sclerosis treatment. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18 (12): 1775-84.
13. Comi C., Fleetwood T., Dianzani U. The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2012; 12 (2): 150-6.
14. Смирнов И.Е., Кучеренко А.Г., Шатилова Н.Н., Кузнецова Л.М. Матриксные металлопротеиназы при рассеянном склерозе у детей. Российский педиатрический журнал. 2011; 6: 4-8.
15. Opdenakker G., Van Damme J. Probing cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases towards better immunotherapies of multiple sclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22 (5-6): 359-65.
16. Warford J., Robertson G.S. New methods for multiple sclerosis drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2011; 6 (7): 689-99.
17. Hagman S., Raunio M., Rossi M., Dastidar P., Elovaara I. Disease-associated inflammatory biomarker profiles in blood in different subtypes of multiple sclerosis: prospective clinical and MRI follow-up study. *J. Neuroimmunol.* 2011; 234 (1-2): 141-7.
18. Talab R., Talabova M., Klzo L. Natalizumab in the treatment of pediatric multiple sclerosis. *Neuro Endocrinol Lett.* 2012; 33 (6): 579-89.

Поступила 05.12.12

Сведения об авторах:

**Кучеренко Алла Георгиевна**, д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. патофизиологии с блоком радионуклидных исследований НИИ педиатрии ФГБУ НЦЗД РАМН, e-mail: kucherenko@nczd.ru;  
**Шатилова Надежда Николаевна**, аспирант отделения психоневрологии и психосоматической патологии НИИ педиатрии ФГБУ НЦЗД РАМН;  
**Кузнецова Людмила Михайловна**, д-р мед. наук, проф., зав. отделением психоневрологии и психосоматической патологии НИИ педиатрии ФГБУ НЦЗД РАМН, e-mail: kuzenkova@nczd.ru