

Окислительный стресс – характерная особенность патогенеза рассеянного склероза

Кротенко Н.В.¹, Алифирова В.М.¹, Иванова С.А.²

The oxidative stress is typical peculiarity by multiple sclerosis

Krotenko N.V., Alifirova V.M., Ivanova S.A.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН, г. Томск

© Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А.

Проблема патогенеза рассеянного склероза является важнейшей в современной неврологии, и ее решение позволит определить патогенетический подход к лечению этого тяжелейшего заболевания. Проведено комплексное клинико-биохимическое исследование у 79 пациентов с рассеянным склерозом и у 75 психически и физически здоровых лиц. В работе проанализированы параметры интенсификации перекисного окисления липидов, состояния ферментативного и ферментативного звеньев системы антиоксидантной защиты при разных клинических формах и стадиях течения рассеянного склероза. Полученные данные подтверждают значимость оксидантного стресса в развитии патологического процесса при рассеянном склерозе.

The problem of pathogenesis of multiple sclerosis is of great importance in modern neurology and its solution allows to determine a pathogenetic approach to treatment of this severe disease. Complex clinical-biochemical investigation has been conducted in 79 patients with multiple sclerosis and 75 mentally and physically healthy persons. Parameters of intensification of lipid peroxidation and indices of the state of enzymatic and non-enzymatic patterns in antioxidant defense system in different clinical forms and at different stages of MS course have been analyzed. The data obtained confirm the presence of oxidant stress in the development of pathological process in MS.

Введение

Интерес к рассеянному склерозу (РС) объясняется его значительным распространением как за рубежом, так и в России. Утрата трудоспособности у большого числа молодых людей, расходы на диагностику, лечение, реабилитацию и социальную помощь обуславливают экономическую и социальную значимость проблемы РС [8]. Наряду с множеством гипотез развития данного заболевания в патохимическом комплексе, формирующемся при РС, центральное место отводится дезинтеграции метаболизма, активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и угнетению антиоксидантных систем (АОС). Гиперпродукция свободных радикалов при РС приводит к разрушению не только клеточных мембран, но и ДНК олигодендроцитов и нейронов с развитием демиелинизации, уменьшения числа аксонов [5, 15].

На основании анализа данных литературы предполагается, что основную роль в разрушении миелина играет усиление процессов ПОЛ и угнетение АОС организма [12]. Нарушение баланса между продукцией свободных радикалов и механизмом антиоксидантного контроля за их содержанием приводит к развитию оксидантного стресса (ОС).

Существует предположение, что имеющая место при РС интенсификация ПОЛ и дисбаланс в АОС [10, 15] как основные проявления ОС сочетаются с развитием синдрома эндотоксикоза [4]. Одним из показателей интоксикации организма являются среднемолекулярные пептиды (СМП). Это продукты распада белков – олигопептиды, чаще являющиеся токсинами с молекулярной массой до 5 000 Да. Данные вещества известны как важные универсальные факторы синдрома эндогенной интоксикации, их уровень соответствует тяжести состояния и от-

ражает степень эндотоксикоза, что выражает снижение функциональной активности систем естественной детоксикации [4]. Предполагая, что спектр биохимических показателей крови при РС может существенно отличаться от таковых у здоровых доноров, проведен анализ биохимических параметров сыворотки крови больных РС.

Цель настоящего исследования — изучение взаимоотношений процессов ПОЛ, показателей эндогенной интоксикации и компонентов АОС в эритроцитах и сыворотке крови больных РС при разных клинических формах и стадиях заболевания.

Материал и методы

Группу исследования составили 79 пациентов с достоверным диагнозом РС, находившихся на лечении в неврологической клинике Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск), которым в ходе работы было проведено комплексное клиничко-биологическое обследование. Диагноз РС установлен в соответствии с международными критериями Мак-Дональда (2005). Группа сравнения состояла из 75 здоровых доноров, проживающих в г. Томске, средний возраст — 31,9 года, аналогичный возрасту пациентов с РС.

Забор крови проводили утром натощак. Состояние ОС оценивали по содержанию в эритроцитах и сыворотке крови ТБК-связывающих веществ в пересчете на концентрацию малонового диальдегида (МДА) как промежуточного и наиболее изученного продукта ПОЛ [7]. Состояние ферментативных и неферментативных систем АОС устанавливали по активности каталазы и содержанию восстановленного глутатиона в сыворотке крови [6]. Для определения эритроцитарной активности антиоксидантных ферментов гемолизаты центрифугировали при 18 тыс. об/мин в течение 90 мин при температуре 4 °С. В полученном супернатанте спектрофотометрически определяли активности глутатионредуктазы [10] и каталазы [9]. Расчет активности ферментов производили на 1 мг белка. Содержание белка в исследуемом образце

определяли по методу Бредфорда [11]. Единица ферментативной активности (U) соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 ммоль субстрата в 1 мин при 25 °С. Уровень эндогенной интоксикации определяли по спектру СМП в сыворотке крови при длине волн 280, 254 и 230 нм скрининг-методом [3].

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows («StatSoft Inc.», 2001). Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе работы было проведено клиническое обследование пациентов с РС по общепринятой схеме [13]. При обследовании больных РС учитывались возраст, пол, время дебюта первых симптомов заболевания, общая длительность болезни. Для объективизации тяжести неврологического дефицита применяли шкалу J. Kurtzke [13] с определением степени инвалидизации и скорости прогрессирования патологии (отношение балла по шкале EDSS к длительности заболевания). Степень тяжести течения болезни оценивали по расширенной шкале состояния инвалидности (EDSS Kurtzke) [13]. Средние значения клиничко-демографических характеристик всей группы больных РС приведены в табл. 1.

Таблица 1

Средние значения клиничко-демографических характеристик для группы исследуемых пациентов с РС

Характеристика	Значение
Средний возраст пациентов, лет	36,95 (16–58)
Женщины/мужчины, абс.	50/29
Средний возраст начала РС, лет	29,50 (12–47)
Средняя длительность РС, лет	11,43 (1–35)
РРС, абс. (%)	55 (64,1)
ВПРС, абс. (%)	24 (28,2)
Средний уровень EDSS, балл	3,87 (0,24%)
Количество человек с баллом по EDSS	
менее 3,0, абс. (%)	21 (38,46)
менее 6,0, абс. (%)	21 (52,56)

менее 8,0, абс. (%)	5 (8,98)
Скорость прогрессирования заболевания	0,68

Соотношение мужчин и женщин в исследуемой группе 1 : 1,72. Цереброспинальная форма заболевания установлена у 62 (84,93%) больных, церебральная —

у 10 (13,70%) и спинальная — у 7 (9,59%). По ряду специфических признаков течения болезни пациенты были разделены на две группы: 1-я — с ремиттирующим РС (РРС) и 2-я — с вторично-прогредиентным РС (ВПРС). Из 55 человек с РРС 33 были в стадии ремиссии и 22 в стадии обострения; из 24 человек с ВПРС 16 пациентов — в стадии ремиссии и 8 — в стадии обострения.

Клиническим признаком ремиссии считалось улучшение состояния больного в виде уменьшения выраженности или исчезновения симптомов длительностью

не менее 1 мес. При наличии в анамнезе достоверных данных об обострениях и ремиссиях без признаков хронического прогрессирования, когда перенесенное обострение оставляло после себя лишь резидуальную симптоматику, которая усиливалась с каждым последующим обострением, тип течения определялся как РРС.

У больных с ремиттирующим течением возраст начала болезни составил в среднем 26 лет, а длительность болезни 11 лет; средний показатель степени тяжести больных — 2,6 балла при скорости прогрессирования 0,5.

ВПРС определялась при наличии в анамнезе четких сведений о перенесенных обострениях и ремиссиях, причем с явной остаточной симптоматикой после очередного обострения. Средний возраст дебюта заболевания составил почти 28 лет, длительность болезни варьировала в широких пределах — от 1 до 33 лет (в среднем 11,15 года). Балл по шкале инвалидности EDSS составил 3,87; скорость прогрессирования 0,86 [1].

Изучение взаимоотношений процессов ПОЛ, показателей эндогенной интоксикации и компонентов антиокислительной защиты (АОЗ) в периферической крови больных РС с разными клиническими формами и стадиями течения заболевания позволит внести вклад в понимание

патогенетических механизмов возникновения РС. В этой связи работа по уточнению механизмов развития РС имеет не только научный интерес, но и важное практическое значение.

При анализе биохимических показателей периферической крови у обследованных пациентов с РС, представленных в табл. 2, отмечалась гипероксидация, что проявлялось увеличением содержания ТБК-активного продукта в эритроцитах и сыворотке крови пациентов с разными клиническими формами РС по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$).

Рассмотрена интенсивность процессов ПОЛ и состояния АОЗ у больных с РРС, разделенных на две примерно равные рандомизированные группы — в стадии ремиссии и в стадии обострения. В обеих группах отмечена вариабельность интенсивности этих процессов. Прослеживается более выраженный достоверный ($p < 0,05$) рост промежуточного продукта ПОЛ малонового диальдегида в сыворотке крови при обострении (в 3,5 раза), в период ремиссии этот показатель увеличен в 2,7 раза. В эритроцитах же в некоторой степени отмечается переокислительная резистентность, красные клетки крови проявляют тенденцию к росту концентрации малонового диальдегида в одинаковой степени как в стадии ремиссии, так и в фазе обострения, увеличение всего на 20%.

Иными являются данные анализа параметров активности АОЗ при РРС в стадии ремиссии и в стадии обострения, а именно: глутатион имеет сниженный уровень в период ремиссии на 26%, а в период обострения на 18% при сравнении с контрольной группой, что может свидетельствовать о некоторой потере глутатионредуктазной активности в структурах периферической крови. Глутатионредуктаза — единственный фермент, который обеспечивает восстановление окисленного глутатиона. С уменьшением содержания восстановленного глутатиона следовало ожидать и снижение глутатионредуктазной активности. Как показано в табл. 3, действительно эритроцитарная активность такого важного фермента, как глутатионредуктаза, у обследованных пациентов с РС очень низкая.

Биохимические характеристики крови при РРС и ВПРС в стадии ремиссии и обострения, $M \pm SD$

Показатель	Здоровые доноры (75 человек)	РРС, ремиссия (33 человека)	РРС, обострение (22 человека)	ВПРС, ремиссия (16 человек)	ВПРС, обострение (8 человек)
МДА сыворотки, мкмоль/л	1,16 ± 0,54	3,09 ± 1,88	4,00 ± 0,76	2,66 ± 1,08	3,82 ± 1,68
МДА эритроцитов, мкмоль/л	43,99 ± 15,9	53,01 ± 26,27	54,19 ± 27,26	50,79 ± 25,27	33,34 ± 9,12
Каталаза сыворотки, мкат/л	71,66 ± 35,50	63,80 ± 26,6	84,98 ± 27,51	68,47 ± 24,36	52,21 ± 24,02
Глутатион сыворотки, мкмоль/л	224,59 ± 65,59	167,13 ± 50,21	184,25 ± 35,53	170,01 ± 35,80	152,85 ± 44,30
СМП 280, усл. ед	0,29 ± 0,09	0,27 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,32 ± 0,19	0,24 ± 0,04
СМП 254, усл. ед	0,32 ± 0,07	0,35 ± 0,1	0,36 ± 0,08	0,34 ± 0,11	0,28 ± 0,06
СПМ 230, усл. ед	0,31 ± 0,15	0,89 ± 0,55	0,82 ± 0,34	0,66 ± 0,34	1,14 ± 0,23
НПИ	1,11 ± 0,80	3,17 ± 2,06	2,51 ± 1,12	2,06 ± 1,85	4,41 ± 1,28
ИА	0,96 ± 0,38	0,80 ± 0,23	0,84 ± 0,20	0,79 ± 0,18	0,86 ± 0,19

Таблица 3

Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах при РС, $M \pm SD$

Группа	Глутатионредуктаза, U/мг белка	Каталаза, mU/мг белка
Здоровые доноры (75 человек)	2,24 ± 0,09	39,48 ± 3,4
Рассеянный склероз (32 человека)	0,796 ± 0,11 ($p = 0,0487$)	123,74 ± 6,2 ($p = 0,00005$)

На наличие дисбаланса в ферментативном звене АОЗ у больных с РРС в стадии ремиссии и в фазе обострения указывают разнонаправленные изменения активности каталазы в сыворотке крови. Во-первых, отмечается уменьшение каталазной активности во время ремиссии на 11% и увеличение ее активности во время обострения на 19% по сравнению со здоровыми донорами. Во-вторых, в стадии обострения при сравнении со стадией ремиссии при РРС активность сывороточной каталазы возрастает на 33%, что, вероятно, вызвано включением компенсаторного механизма ферментативной системы АОЗ.

Инициация ПОЛ, приводящая к увеличению ТБК-активируемых продуктов, безусловно, влияет на такие факторы АОС, как каталаза и глутатион. Происхождение сывороточной каталазы при острых воспалительных процессах не до конца ясно, наиболее вероятно ее выделение из разрушенных клеток. В то же время в результате действия протеолитических ферментов во внеклеточных жидкостях каталаза быстро

теряет свою активность. Таким образом, при РРС на фоне повышенной интенсивности процессов ПОЛ отмечены более выраженный дисбаланс в звене восстановленный глутатион — глутатионредуктаза и компенсаторная активация каталазы крови в период обострения РС.

Результаты анализа параметров окислительного стресса при ВПРС в период ремиссии и в фазе обострения также вариabельны. Прослеживается более выраженный достоверный рост малонового диальдегида в сыворотке крови (в 3,3 раза) при обострении ($p < 0,05$), в период ремиссии этот показатель увеличен в 2,3 раза по сравнению с контролем. В эритроцитах же больных с ВПРС в стадии ремиссии и в стадии обострения обнаружены разнонаправленные изменения: во время ремиссии зафиксирована тенденция к увеличению малонового диальдегида (на 13%), а во время обострения красные клетки крови проявляют тенденцию к уменьшению концентрации малонового диальдегида на 24% при сравнении с контрольными величинами. Параметры ферментативного и неферментативного звена АОЗ в сыворотке крови в стадиях ремиссии и обострения при ВПРС имеют тенденцию к снижению в сравнении со здоровыми донорами, причем в период обострения изменения более выражены: активность каталазы снижена на 27%, а уровень глутатиона на 32%. Баланс между перекисными процессами и антирадикальной защитой в значительной степени определяется обменом неферментативного компонента АОС — глута-

тиона и его резервами. Тесная связь интенсивности процессов ПОЛ и метаболизма глутатиона была подтверждена В.Е. Высокогорским [2].

Если рассматривать общие тенденции, то при ВПРС в период ремиссии и в фазе обострения происходит уменьшение концентрации неферментативных компонентов АОС – восстановленного глутатиона и ферментативной активности каталазы в сыворотке крови. Вероятно, ферментативное и неферментативное звенья АОЗ первыми реагируют на ОС, участвуя в обезвреживании свободных радикалов. Следовательно, во время обострения при ВПРС на фоне повышенной интенсивности процессов ПОЛ в сыворотке крови отмечаются более выраженные процессы истощения каталазной активности крови, сочетающиеся с возможным усилением окислительной деструкции глутатиона.

Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали достоверное повышение интенсивности процессов ПОЛ у больных РС при любой его форме и стадии. Отмечены некоторые особенности компенсаторной активности ферментативного звена и дисбаланс неферментативного звена АОЗ в сыворотке крови, наиболее выраженный в цепи восстановленного глутатиона – глутатионредуктаза. Все это подтверждает роль ОС в развитии РС.

Анализ данных об эритроцитарной активности глутатионредуктазы и каталазы у обследованных пациентов с РС, представленных в табл. 3, показал, что активность глутатионредуктазы у больных в 2,8 раза ниже, чем у здоровых людей, а каталазная активность, напротив, достоверно ($p < 0,05$) повышена в эритроцитах у пациентов с РС в 3,1 раза в сравнении с лицами контрольной группы. Полученные результаты позволяют предположить, что активность каталазы в эритроцитах больных увеличивается в связи с увеличением в организме количества АФК, в том числе перекиси водорода, появление которых обусловлено ОС, вызванным действием определенных этиологических факторов.

Причинные факторы возникновения синдрома эндогенной интоксикации разнообразны и сложны по своей природе. Деструктивные процессы, лежащие в основе этого синдрома, как правило, связаны с нарушениями структуры и функции мембран и в целом рассматриваются как реакции метаболического полома. Развитие синдрома эндогенной интоксикации, начиная от первичного поражения тканей и до генерализации процесса, не является специфическим. Накопление СМП выступает не только маркером эндотоксикации, но и фактором, усугубляющим течение патологического процесса, приобретая роль вторичных токсинов, оказывая влияние на функции органов и систем.

В ходе исследования СМП у пациентов с РС и ВПРС в зависимости от фаз ремиссии или обострения (см. табл. 1) выявлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение почти втрое нуклеарной фракции E_{230} в сравнении с контролем, причем это увеличение особенно выражено у пациентов с ВПРС в фазе обострения (в 3,5 раза). Нуклеарная фракция E_{230} представлена эндогенными патогенами в виде белков-гистонов, продуктов разрушения ДНК, вышедшими из цитозоля в межклеточную среду, лимфоток и кровь при нарушении целостности клеточных мембран. Можно полагать, что резкое повышение нуклеарной фракции E_{230} как в ремиссии, так и при обострении процесса указывает на увеличение в крови остатков нуклеиновых кислот, что может быть следствием усиления апоптоза [14].

В меньшей степени изменяется токсическая фракция E_{254} , которая состоит из гидрофобных токсинов, обладающих высоким сродством к биологическим структурам, находящимся в плазме практически полностью в связанном состоянии в виде комплексов с альбумином или липопротеинами низкой плотности. В большинстве случаев возникшая эндогенная интоксикация утяжеляет течение основного заболевания и определяет исход болезни.

Заключение

Анализ полученных результатов свидетельствует о нарушении прооксидантно-антиокси-

дантного равновесия у пациентов при любой форме и стадии РС и указывает на непрерывность течения патологического процесса. Преобладание пероксидации — наработки свободных радикалов — над пониженной способностью АОС их элиминировать характеризует развитие ОС у обследуемых пациентов. При РРС в стадиях ремиссии и обострения зафиксировано компенсаторное увеличение каталазы сыворотки только при обострении заболевания, а показатели перекисной резистентности эритроцитов проявляли тенденцию к росту и при ремиссии, и при обострении процесса, что одновременно сопровождалось повышением фона СМП в сыворотке крови, также отражающих прооксидантные процессы. Снижение уровня глутатиона отмечено как в фазу ремиссии, так и при обострении РРС.

При ВПРС на фоне более выраженной сывороточной интенсификации процессов ПОЛ определяются более низкие показатели активности АОЗ и многократное увеличение нуклеарной фракции СМП как проявление некоторой «усталости» и дисбаланса. В ферментативном звене АОЗ при ВПРС отмечены истощение каталазной активности крови и более выраженный дисбаланс в звене восстановленного глутатиона — глутатионредуктаза. Все это указывает на развитие ОС с определенными особенностями для каждой из клинических стадий течения РС.

Проведенное исследование подтвердило взаимосвязь дисбаланса прооксидантно-антиоксидантного равновесия с типом и стадией течения РС, что предполагает целесообразность внедрения в практику лекарственных средств с антиоксидантными и метаболическими свойствами. В данном исследовании отмечено изменение процессов эндотоксикоза у пациентов с РРС и ВПРС в фазах ремиссии и обострения по сравнению с группой контроля, что указывает на тяжесть патологического процесса. Вследствие этого спектр СМП можно рассматривать в качестве объективного критерия метаболических нарушений при РС и оценки эффективности проводимой терапии.

Полученные результаты позволяют наиболее полно охарактеризовать клинические формы и стадии РС, способствуют дальнейшему углублению понимания механизмов формирования РС, включающего изменение биохимических реакций организма. Требуются разработки тактики мероприятий, направленных на активацию компенсаторных реакций биохимических составляющих гомеостаза. Выявленные показатели свидетельствуют о важной роли процессов ПОЛ и снижении активности АОС, являющейся лимитирующим звеном свободнорадикальных процессов при любой форме и стадии РС, что следует учитывать при проведении лечебных мероприятий у пациентов с данной патологией.

Литература

1. Белкина А.А. Биохимические механизмы нарушения нейроиммунного взаимодействия при рассеянном склерозе // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2000. № 11. С. 42—46.
2. Высокогорский В.Е., Самусева Н.Л. и др. Интенсивность свободнорадикальных процессов и нарушение закономерностей органогенеза у пренатально алкоголизированного потомства // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. 2003. № 1. С. 69—72.
3. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. 2000. Минск: Беларусь. Т. 1. С. 344—350.
4. Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (Обзор литературы) // Клинич. лаб. диагностика. 2004. № 3. С. 56—59.
5. Луцкий А.А., Есауленко И.Э. Оксидантный стресс в патогенезе рассеянного склероза // Рассеянный склероз. 2006. № 3. С. 26—30.
- 6.

Материалы 5-й Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии»

7. *Медицинские лабораторные технологии: Справочник* / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999. С. 656.
8. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Методы определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современ. методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 66—67.
9. *Шмидт Т.Е.* Дифференциальная диагностика рассеянного склероза // Невролог. журн. 2004. № 3 С. 11—22.
10. *Beers R.F., Sizer J.W.* // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. P. 133—140.
11. *Carbery J., Mannervic B.* // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 5475—5480.
12. *Bredford M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—354.
13. *Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy // J. Neurol. 2004. V. 251. № 3. С. 261—268.
14. *Kurtzke J.F.* The diagnosis of multiple sclerosis / C.M. Poser eds. NY: Thieme-Stratton, 1984. P. 3—13.
15. *Okuda Y., Apatoff B.R., Posnett D.N.* Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis // J. Neuroimmunol. 2006. V. 171. № 1—2. P. 163—170.
16. *Smith K.J., Kapoor R., Felts P.A.* Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. Brain Pal hoi. P. 69—92.