



4846344

КРОТЕНКО НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ТЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

14.01.11 – первые болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

12 МАЙ 2011

Иркутск – 2011

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития России (г. Томск)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Алифорова Валентина Михайловна

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Иванова Светлана Александровна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Быков Юрий Николаевич,

доктор медицинских наук, профессор
Прокопенко Семен Владимирович

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита диссертации состоится « 1 » 06 2011 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ДМ208.031.01 при ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 664079, г. Иркутск, микрорайон Юбилейный, 100.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Автореферат разослан « _____ » _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

Стародубцев А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема рассеянного склероза (РС) обусловлена ежегодным увеличением количества людей, страдающих этим заболеванием. В связи с наступлением неизбежной инвалидизации при данной болезни, происходит выключение из активной жизни большого числа трудоспособных лиц. Это объясняет необходимость значительных затрат на диагностику, лечение, реабилитацию и социальную помощь больным [Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н., 2004; Дзюба А.Н., Сорокин Ю.Н., 2008; Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н., 2010; Hafler D.A., 2004; Rog D.J., Nurmikko T.J., Friede T. et al., 2005; Solaro C., 2006; Tremlett H. et al., 2006]. Болезнь, как правило, протекает с неуклонным прогрессирующим, и причина возникновения РС на сегодняшний день остаётся неясной [Мак Дональд В.Я. и др., 2003; Гусев Е.И., Бойко А.Н., 2007; Wehman-Tubbs K. et al., 2005; Ziemssen T., 2005; Pittock S.J. et al., 2007].

Современный взгляд на этиологию РС предполагает мультифакториальность, поскольку настоящее заболевание у конкретного человека может возникнуть в результате комбинации неблагоприятных факторов: инфекций, интоксикаций, места проживания, психологических травм [Гусев Е.И., Бойко А.Н., 2001; Столяров И.Д., 2002; Столяров И.Д., Бойко А.Н., 2008; Vjarmar C. et al., 2001; Ramsaransing G., 2001; Dwosh E., Guimond C., Sadovnick A.D., 2003; Hauser S.L., Oksenberg J.R., 2006; Pugliatti M., Rosati G., Carton H. et al., 2006].

Немаловажную роль в развитии демиелинизирующих заболеваний ЦНС, в том числе и РС, играют процессы окислительного стресса [Завалишин И.А., Захарова М.Н., 1990; Скулачёв В.П., 2005, 2009; Луцкий М.А., Есауленко И.Э., 2006; Rovaris M. et al., 2006]. Пусковым механизмом окислительного стресса является интенсивная гиперпродукция свободных радикалов, повышение окислительной деструкции белков и липидов, что приводит к разрушению клеточных структур, митохондриальных ферментов, аминокислот, ДНК олигодендроцитов и нейронов с развитием демиелинизации и уменьшением числа аксонов [Smith K.J., Kapoor R., Felts P.A., 2007].

В последние годы все большую актуальность, по данным мировой литературы, приобретают работы по изучению взаимосвязи биохимических процессов и клинической симптоматики при разных типах течения заболевания [Малкова Н.А., Иерусалимский А.П., 2006; Бойко А.Н. и др., 2007; Алексеенко Е.В. и др., 2008; Елагина И.А., Шмидт Т.Е., 2008; Мусина Н.Ф., 2008; Парфенов В.А. и др., 2010; Jongen P., 2006; Vannotti S. et al., 2006]. В этой связи изучение окислительного стресса в зависимости от клинических проявлений позволит конкретизировать механизмы патогенеза РС для более эффективного проведения лечебных мероприятий.

Цель работы – изучить особенности прооксидантных и антиоксидантных систем организма в зависимости от типа течения, стадии, тяжести и длительности патологического процесса у пациентов с рассеянным склерозом для установления дополнительных критериев прогноза и дифференцирования типов течения заболевания.

Задачи исследования:

1. Выявить особенности клинических проявлений при разных типах течения рассеянного склероза, частоты обострений и степени выраженности неврологического дефицита.

2. Изучить прооксидантные процессы у пациентов с различными типами течения и стадиями рассеянного склероза.

3. Оценить уровень антиоксидантной защиты крови у больных рассеянным склерозом исследуемых групп и у здоровых лиц.

4. Оценить уровень эндогенной интоксикации у пациентов в исследуемых группах при рассеянном склерозе.

5. Исследовать уровни антител к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови в стадии обострения и ремиссии в зависимости от типа течения рассеянного склероза.

Научная новизна. Впервые показано, что манифестация клинических проявлений РС зависит от типа течения заболевания. Обострения болезни чаще возникают у лиц со слабо выраженным неврологическим дефицитом. Характер

дебюта заболевания определяет прогноз состояния пациента. Впервые установлено, что у больных с РС наблюдается повышенная активность прооксидантных процессов, при этом степень выраженности окислительного стресса зависит от типа течения и стадии болезни. Впервые оценено состояние гуморального иммунного ответа у больных с РС по уровню антител к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови. При ремиттирующем типе течения (РРС) обнаруживается максимальный уровень антител к обеим молекулам ДНК. С увеличением тяжести патологического процесса (при прогрессирующих типах течения РС - ВПРС и ППРС) степень повышения титра антител резко убывает. Гуморальный ответ при ППРС наиболее угнетён. Впервые выявлено изменение спектра молекул средней массы в сторону увеличения их нуклеарной фракции при всех типах течения РС. Получены новые данные, отражающие активность ферментов глутатионового обмена как ключевого процесса антиоксидантной защиты у пациентов с РС. Впервые обнаружены изменения активности АОФ в эритроцитах больных при всех типах течения РС по сравнению с контролем. Выявлена разнонаправленность изменения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах: активность данного фермента усиливается при РРС, тогда как при ВПРС происходит ее снижение.

Практическое значение работы. Проведенное исследование выявило закономерности изменений клинических проявлений РС в связи с биохимическими особенностями реагирования окислительных и антиокислительных систем организма в зависимости от типа течения, стадии, тяжести и длительности патологического процесса у пациентов. Выделены информативные биологические показатели в качестве дополнительных методов дифференциальной диагностики ремиттирующего и прогрессирующих типов течения РС. Выявленное повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах при РРС и снижение её при ВПРС позволяет использовать этот факт для расширения лабораторных методов обследования пациентов. Результаты исследования выраженности эндотоксикоза у лиц с РС представлены в пособии для врачей «Клинико-диагностическое значение молекул средней массы у больных психическими и

неврологическими расстройствами» и в заявке № 2010124222/15(034526) на изобретение «Способ дифференциальной диагностики ремиттирующего и вторично-прогрессирующего типа течения рассеянного склероза» (приоритетная справка от 11.06.2010).

Внедрение результатов работы. Основные положения настоящей работы используются в педагогической, научной и клинической практике на кафедре неврологии и нейрохирургии ГОУ ВПО СибГМУ Министерства здравоохранения и социального развития России. Результаты исследования применяются для определения активности антиоксидантных ферментов, антител к нативной и денатурированной ДНК, оценки степени эндотоксикоза в периферической крови пациентов с рассеянным склерозом. Предложенные методики внедрены в работу неврологического отделения ММЛПУ «Городская больница № 3», клиники ГОУ ВПО СибГМУ Минздрава и социального развития России, а также введены в учебный процесс на кафедре неврологии и нейрохирургии СибГМУ, в программу подготовки врачей-ординаторов и аспирантов УРАМН «НИИПЗ СО РАМН». Опубликовано пособие для врачей «Клинико-диагностическое значение молекул средней массы у больных психическими и неврологическими расстройствами».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для больных рассеянным склерозом характерен дисбаланс в функционировании прооксидантных и антиоксидантных механизмов, проявляющийся повышением процессов перекисного окисления липидов и угнетением активности глутатион-зависимых антиокислительных ферментов.
2. Окислительный стресс сопряжён с клиническими характеристиками рассеянного склероза и зависит от типа его течения, стадии и длительности заболевания.
3. Уровни антител к нативной и денатурированной ДНК в совокупности с изменениями в спектре молекул средней массы свидетельствуют о наибольшей активности патологического процесса на начальных этапах рассеянного склероза.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены и обсуждены на VIII Международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007); на XIII отчётной сессии НИИ психического здоровья СО РАМН (с международным участием), посвящённой 100-летию О.В. Кербикова «Актуальные вопросы психиатрии и наркологии» (Томск, 2007); на XII и XIII Всероссийских конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука и образование» (Томск, 2008, 2009); на VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008); на Шестой Межрегиональной научно-практической конференции, посвящённой смежным вопросам неврологии и психиатрии «Актуальные вопросы неврологии» (Новосибирск, Томск, 2009); на 9th World Congress of Biological Psychiatry (Paris, France, 2009); на the 22nd European College of Neuropsychopharmacology Congress (Istanbul, Turkey, 2009); на the 23rd European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress (Amsterdam, The Netherlands, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ, из которых 4 статьи - в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата наук. Получена заявка № 2010124222/15(034526) на изобретение «Способ дифференциальной диагностики ремиттирующего и вторично-прогрессирующего типа течения рассеянного склероза» (приоритетная справка от 11.06.2010).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

Проведено комплексное клиничко-биологическое обследование больных с верифицированным диагнозом (рассеянный склероз) с помощью диагностических критериев McDonald (2001, 2005), проходивших курс терапии в клинике первых болезней СибГМУ или состоящих на амбулаторном учете. Группу больных РС составили 90 человек, в контрольную группу вошли 75 практически здоровых лиц того же возраста, 38 женщин (средний возраст – 36 лет) и 37 мужчин (средний возраст – 31 год). Соотношение мужчин и женщин в изучаемой группе с РС равнялось 1:1,57. Женщины составили 61,12% всех больных (55 че-

ловек), мужчины — 38,88% (35 человек). Средний возраст больных на момент обследования составил 36 лет (от 15 до 58 лет), средний возраст начала заболевания $25,38 \pm 8,45$ лет и длительность болезни — $10,35 \pm 7,19$ лет (от 1 года до 19 лет). Выраженность неврологического дефицита оценивалась по функциональным шкалам Куртцке [Kurtzke J.F., 1983] с определением суммы баллов неврологического дефицита (Functional System scales – функциональная система – FS) и степени инвалидизации (Expanded Disability Status Scale – расширенная шкала степени инвалидизации – EDSS).

Суммарный неврологический дефицит (СНД) подсчитывали как сумму баллов, характеризующих повреждение по восьми функциональным системам – FS шкалам [Poser С.М. et al., 1983; Kurtzke J.F., 1983], он составил $8,17 \pm 0,35$. Средний балл по шкале EDSS у обследованных пациентов был равен $3,94 \pm 1,45$ (1,0–5,5) баллов. Скорость прогрессирования определялась как отношение балла по шкале EDSS к длительности заболевания, у больных с РС она имела значение $0,79 \pm 0,01$ (0,25-1,86) ($p=0,002$).

Тип течения болезни у 57 (63,3%) больных ремиттирующий (РРС), у 22 (24,44%) - вторично-прогрессирующий (ВПРС), у 11 (12,23%) - первично-прогрессирующий (ППРС).

Комплекс лабораторных методов исследований для оценки состояния АОС включал: ПОЛ, эндогенную интоксикацию, ферментативную и неферментативную активности АОС в периферической крови и уровень антител к нативной и денатурированной ДНК. В качестве материала исследования использовались эритроциты, плазма и сыворотка периферической крови пациентов. Кровь для биологических исследований брали из локтевой вены, утром, натощак в асептических условиях. Перекисное окисление липидов оценивали по уровню МДА (ТБК-активного продукта) в эритроцитах и плазме крови [Коробейникова Э.Н., 1989; Камышников В.С., 2004]; параметры эндогенной интоксикации - по спектру молекул средней массы в сыворотке крови [Парфенкова Г.А., Чернядьева И.Ф., 1997]. Состояние ферментативных систем АОС определяли по активности антиоксидантных ферментов (АОФ) в эритроцитах: ГП - глутатионпероксидазы

[Little C., 1968], ГР - глутатионредуктазы [Carbery J., Mannervic B., 1975], ГТ - глутатион-S-трансферазы [Keen J.H., 1976], каталазы [Beers R.F., Sizer J.W., 1952, 1978], СОД – супероксиддисмутазы [Смирнова Л.П., 2004], Г6ФДГ - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Кочетов Г.А., 1971]. За единицу ферментативной активности (U) принимали количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25 С° [Кочетов Г.А., 1971]. Расчет удельной активности фермента производили на мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [Lowry O.H., 1951]. Состояние неферментативного звена АОС находили по уровню восстановленного и окисленного глутатиона в плазме [Карпищенко А.И., 1999] и эритроцитах [Hissin P.J., 1976].

Для иммуноферментного определения IgG-антител к однопочечной и двухпочечной ДНК в сыворотке крови использовали тест-системы “Векто-ssДНК-IgG” и “Векто-dsДНК-IgG” производства ЗАО “Вектор-Бест” (Россия). Относительное содержание анти-ДНК АТ в исследуемых образцах выражали в единицах оптического поглощения при 450 нм (ед. А₄₅₀).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica, версия 6.0 для Windows (StatSoft. Inc., 2001). Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента и с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. При оценке результатов исследований использован метод корреляционного анализа, с расчетом коэффициента парной корреляции по Пирсону.

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Клинико-демографическая характеристика обследуемых пациентов в зависимости от типа течения рассеянного склероза.

Изучение клинического материала проводилось в зависимости от типа течения РС. Средний возраст пациентов с РРС составил 31,00±1,18 год (21,00-37,00); с ВПРС – 44,00±1,26 года (32,00-45,00) и с ППРС – 54,00±0,94 года (52,00-56,00). При РРС средний возраст дебюта заболевания – 23 года, сумма неврологического дефицита - 7 баллов при средней скорости прогрессирования

0,433(0,25-0,72) и средняя степень инвалидизации больных по шкале Kurtzke - $2,5 \pm 1,45$ балла. У пациентов при ВПРС средний возраст дебюта заболевания составил 28 лет, сумма неврологического дефицита - 10 баллов при средней скорости прогрессирования 0,671(0,34-1,08) и средняя степень инвалидизации больных по шкале Kurtzke - $3,5 \pm 1,37$ балла. У пациентов при ППРС средний возраст дебюта заболевания составил 44 года, сумма неврологического дефицита - 15 баллов при средней скорости прогрессирования 0,863(0,65-1,86) и средняя степень инвалидизации больных по шкале Kurtzke - $4,0 \pm 0,75$ балла.

Таким образом, максимальная степень инвалидизации по шкале Куртки выявляла у пациентов с ППРС. Наибольшая выраженность неврологических нарушений у пациентов с умеренной и тяжелой инвалидизацией отмечалась в период от 5 до 10 лет от начала болезни. При длительности заболевания более 10 лет благоприятное течение РС наблюдалось преимущественно у более молодых пациентов с РРС.

При ППРС не отмечалось повреждение зрительного анализатора, но в большей степени поражался пирамидный тракт. Нарушения функции пирамидного тракта, черепных нервов и «тазовые» расстройства выражались намного грубее у пациентов с ВПРС по сравнению с РРС. Нарушения в двигательной области чаще всего наблюдались при ППРС. Известно, что рассеянный склероз характеризуется непрекращающимся во времени процессом и проявляется клинически в виде периодов обострений или в форме непрерывно прогрессирующего процесса с быстрым развитием инвалидизации. Среди обследованных пациентов с РРС ремиссия наблюдалась у 33 человек, обострение болезни - у 24 человек. Обострение при ВПРС было у 7 пациентов, без обострения обследовано 16 пациентов.

2.2. Показатели про- и антиоксидантной системы в периферической крови при различных типах течения рассеянного склероза

Было установлено увеличение концентрации МДА в эритроцитах в среднем на 20 % и в плазме крови - в 3 раза у пациентов с РС при всех типах течения заболевания по сравнению с контролем (табл. 1). Обнаружено, что у пациентов с РС

концентрация окисленного глутатиона в эритроцитах повышена до $0,231 \pm 0,02$ мМ, что на 36,7 % ($p < 0,05$) превышает аналогичную величину в контроле, которая равняется $0,169 \pm 0,017$ мМ. Активность каталазы в эритроцитах у пациентов с РС превышает каталазную активность у контрольной группы в среднем в 1,6 раза ($p < 0,05$) при всех типах течения заболевания. Активность каталазы плазмы у пациентов с РС почти не изменяется, уровень её активности при РРС близок к контрольным показателям, а при ВПРС и ППРС имеется тенденция к снижению на 6% и 18%, соответственно. Происхождение плазменной каталазы при 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.

Таблица 1

Показатели про- и антиоксидантной системы крови
при различных типах течения рассеянного склероза ($M \pm SD$)

Показатель	Все группы РС n = 90	РРС n = 57	ВПРС n = 22	ППРС n = 11	Контрольная группа n = 75
МДА эритроцитов Мкмоль	$52,77 \pm 26,12$ (n/з)	$53,12 \pm 23,73$ ($p < 0,05$)	$54,23 \pm 25,58$ ($p < 0,05$)	$50,95 \pm 18,50$ (n/з)	$39,57 \pm 11,64$
МДА плазмы Мкмоль	$3,01 \pm 1,74$ ($p < 0,05$)	$3,26 \pm 1,55$ ($p < 0,05$)	$3,33 \pm 1,67$ ($p < 0,05$)	$3,32 \pm 1,55$ ($p < 0,05$)	$1,16 \pm 0,54$
Каталаза эритроцитов $U \times 10^3 / \text{мг белка}$	$121,68 \pm 17,64$ ($p < 0,05$)	$119,48 \pm 19,07$ ($p < 0,05$)	$123,74 \pm 16,20$ ($p < 0,05$)	$119,98 \pm 16,72$ (n/з)	$77,01 \pm 15,25$
Каталаза плазмы mKAT/литр	$72,23 \pm 30,81$ (n/з)	$72,75 \pm 28,24$ (n/з)	$67,27 \pm 31,43$ (n/з)	$58,67 \pm 24,59$ (n/з)	$71,66 \pm 35,50$
Восстановленный глутатион плазмы Мкмоль	$199,19 \pm 104,45$ (n/з)	$176,06 \pm 98,57$ (n/з)	$163,15 \pm 38,01$ (n/з)	$272,16 \pm 68,90$ (n/з)	$224,59 \pm 65,59$

Примечание: $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с контрольной группой, n/з - нет статистически значимых отличий

Повышение концентрации МДА в крови сопровождается изменением уровня восстановленного глутатиона, у пациентов с РРС отмечено снижение уровня восстановленного глутатиона в плазме крови на 13%, у пациентов с ВПРС – на 27,4%, а у пациентов с ППРС - увеличение на 21% в отличие от контроля.

2.3. Биохимические характеристики крови в зависимости от наличия обострения при РРС и ВПРС

На момент обследования обострение наблюдалось у 24 пациентов с РРС и у 7 пациентов с ВПРС. При РРС обострения болезни происходили 4 раза в год, при ВПРС – 2 раза в год. Анализ биохимических показателей крови с РРС и ВПРС при обострении и при его отсутствии представлены в таблице 2.

Наблюдается увеличение концентрации продуктов ПОЛ у пациентов с разными клиническими стадиями РС, что проявляется повышенным содержанием ТБК-активного продукта, как в эритроцитах, так и в плазме крови по отношению к контролю, исключением являются больные с ВПРС. При обострении их эритроциты проявляют тенденцию к уменьшению концентрации МДА на 24% при сравнении с контролем.

Таблица 2
Зависимость биохимических характеристик крови от наличия обострения при РРС и ВПРС, (M±SD)

Показатели	Контрольная группа n = 75	РРС Ремиссия n = 33	РРС Обострение n = 24	ВПРС Без обострений n = 15	ВПРС Обострение n = 7
МДА плазмы мкмоль/литр	1,16±0,54	3,09±1,88 p<0,05	4,00±0,76 p<0,05	2,66±1,08 p<0,05	3,82±1,68 p<0,05
МДА эритроцитов мкмоль/литр	39,57±11,64	53,01±26,27 н/з	54,19±27,26 н/з	50,79±25,27 н/з	33,34±9,12 н/з
Каталаза плазмы мКАТ/литр	71,66±35,50	63,80±26,6 н/з	84,98±27,51 н/з	68,47±24,36 н/з	52,21±24,02 н/з
Восстановленный глутатион плазмы, мкмоль/литр	224,59±65,59	167,13±50,21 н/з	184,25±35,53 н/з	170,01±35,80 н/з	152,85±44,30 н/з

Примечание: p<0,05 - достоверность различий по сравнению с контрольной группой, н/з - нет статистически значимых отличий.

Можно предположить, что при обострении ВПРС процессы ПОЛ в эритроцитах снижены благодаря реакции АОС, ведущей к частичному снижению уровня гипероксидации у данной группы пациентов [Besler H.T., Comoglu S., 2003; Ferretti G., Vacchetti T., Principi F., et al., 2005].

При всех типах течения РС как в стадии обострения, так и вне её, восстановленный глутатион имеет тенденцию к снижению относительно контроля, что

может свидетельствовать о некоторой потере глутатионредуктазной активности в структурах периферической крови.

Глутатионредуктаза – единственный фермент, который обеспечивает восстановление окисленного глутатиона. Действительно, эритроцитарная активность глутатионредуктазы у обследованных пациентов с РС очень низкая при всех типах течения РС (таблица 3).

Усиление активности каталазы на 13,6% как ферментативного компонента АОЗ, проявляется только при РРС в стадии обострения, во всех остальных случаях активность каталазы уменьшается.

Увеличение уровня ИОЛ в сочетании с дисбалансом в звене «восстановленный глутатион — глутатионредуктаза» и компенсаторной активацией каталазы крови в период обострения РС косвенно свидетельствует о вовлеченности ОС в механизмы разрушения миелиновой оболочки аксонов и последующей аксональной дегенерацией с развитием стойкого неврологического дефицита.

2.4. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах при различных типах течения рассеянного склероза

Физиологическим регулятором интенсивности процессов ИОЛ является эндогенная АОС. Повышение интенсивности свободнорадикальных процессов у больных с РРС и ВПРС сопровождается изменениями в ферментативном звене АОЗ. В целях более полной характеристики состояния ОС при разных типах течения РС исследовалась эритроцитарная система эндогенной ферментативной АОЗ, представленная глутатионзависимыми ферментами - ГП, ГР, ГГ, а также СОД, каталазой, Г6ФДГ, активность которых показана в таблице 3.

У пациентов с РС выявляется дисбаланс в работе АОС, выражающийся в изменении активности АОФ. Показано увеличение активности СОД и каталазы у больных РРС в 1,3 и 1,5 раза, а при ВПРС в 1,7 и 1,6 раза, соответственно, относительно контроля ($p < 0,05$).

Активация СОД и каталазы, возможно, связана с наличием избыточных концентраций их специфических субстратов – активных форм кислорода (АФК) – супероксидного анион-радикала и перекиси водорода, что и подтверждает по-

вышение интенсивности процессов свободнорадикального окисления липидов у пациентов при различных типах течения РС, это нашло свое отражение и в показателях активности звена глутатионзависимых АОФ.

Таблица 3

Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах у пациентов с разными типами течения рассеянного склероза (M±SD)

Показатель	Все группы РС в целом n = 90	РРС n = 57	ВПРС n = 22	Контрольная группа n = 75
Каталаза Ux10 ³ / мг белка	121,68±17,64 (p<0,05)	119,48±19,07 (p<0,05)	123,74±16,20 (p<0,05)	77,01±15,24
Глутатион-пероксидаза U/ мг белка	43,01±4,88 (p<0,05)	60,66±9,76 (p<0,05)	54,05±7,67 (p<0,05)	19,80±3,17
Глутатион-редуктаза U/ мг белка	1,45±0,35 (p<0,05)	2,16±0,25 (p<0,05)	1,22±0,15 (p<0,05)	3,74±0,47
Глутатион-S-трансфераза U/ мг белка	5,62±0,73 (p<0,05)	4,90±1,04 (p<0,05)	9,98±2,64 (p<0,05)	15,03±4,16
Супероксиддисмутаза U/ мг белка	1,49±0,37 (p<0,05)	1,29±0,34 (p<0,05)	1,68±0,47 (p<0,05)	0,98±0,12
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа U/ мг белка	6,12±0,94 (p<0,05)	8,55±1,89 (p<0,05)	3,46±0,29 (p<0,05)	4,72±1,38

Примечание: p<0,05 - достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Активность ГП повышена в 3 раза при РРС и в 2,7 раза при ВПРС в сравнении с контролем (p<0,05). Вероятно, имеет место увеличение общего количества липо- и гидропероксидов, являющихся субстратом для активации ГП, вследствие усиления окислительных процессов в клетке (МДА в эритроцитах пациентов с РРС и ВПРС выше, чем у здоровых лиц, табл. 1). При прогрессировании патологического процесса при ВПРС и ППРС, а именно, при сочетанном увеличении в эритроцитах МДА, активности ГП, СОД, каталазы может иметь место истощение ресурсов АОС, ведущих к нарушению антиоксидантного гомеостаза. В противоположность СОД, каталазе, ГП - активность ГР и ГТ снижалась у пациентов при разных типах течения РС. Так, активность ГР у больных

РРС была в 1,7 раза, а при ВПРС - в 3,1 раза ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Снижение ГР может быть связано с системой "окисленный глутатион - восстановленный глутатион" и с уровнем НАДФН в эритроцитах. Уменьшение активности ГР находится в соответствии с нашими данными о снижении концентрации восстановленного глутатиона в крови у пациентов с РРС и ВПРС. Вероятнее всего, это обусловлено повышенной окислительной деструкцией глутатиона, так как поддержание достаточного уровня восстановленного глутатиона, окисляющегося при функционировании глутатионзависимой антиперекисной системы, осуществляется специфическим для него ферментом – глутатионредуктазой при наличии оптимального количества НАДФН. Таким образом, полученные данные подтверждают выраженный дисбаланс в звене глутатионредуктаза - восстановленный глутатион.

Активность ГТ также снижена по отношению к контролю у пациентов с РРС в 3 раза и в 1,5 раза у ВПРС ($p < 0,05$). Снижение активности фермента ГТ, возможно, связано с действием АФК, которые делают фермент еще более уязвимым. В частности, продукты взаимодействия АФК с липидами способны оказывать инактивирующее действие на ГТ путем окисления SH-групп аминокислотных остатков в активном центре фермента. Активность ГТ при наличии ОС в клетке может подавляться вследствие активации фосфолипазы A_2 и появлением избытка свободных жирных кислот [Ланкин В.З. и др., 2000]. Угнетение активности ГТ при РРС является свидетельством нарушения равновесия в окислительном метаболизме при демиелинизирующих процессах. Отличительной особенностью ферментативной активности в эритроцитах у пациентов с РС при разных типах течения болезни является разнонаправленность изменения активности Г6ФДГ: повышение при РРС на 81,1% и снижение при ВПРС на 26,7 %.

Увеличение активности Г6ФДГ эритроцитов у пациентов при РРС относительно контроля можно рассматривать как механизм компенсации повышенного расхода НАДФН, используемого для восстановления глутатиона, на актива-

цию эндогенной антиоксидантной системы, а также на биосинтетические процессы, обеспечивающие миелинизацию поврежденных нервных волокон.

Снижение активности ГбФДГ в эритроцитах у больных с ВПРС, в сравнении с РРС и контролем, говорит о недостатке этого фермента только у пациентов с ВПРС. Не исключено, что этот дефицит фермента приводит к более тяжелому течению данного типа РС, так как ГбФДГ является основным поставщиком восстановленного НАДФН, необходимого для нормального функционирования окислительно-восстановительной системы клетки [Луцкий М.А. и др., 2001].

Получена картина изменений в ферментативной АОС организма у больных РРС, указывающая на участие ОС в патогенезе заболевания. Высокий уровень активности ГП и каталазы позволяет делать вывод об активно идущих в организме больных процессах ПОЛ.

2.5. Анализ уровня молекул средней массы и антител к ДНК в сыворотке периферической крови у пациентов при различных типах течения рассеянного склероза

Для более полной характеристики ОС у пациентов с РС в работе получена количественная оценка состояния гуморального ответа по выработке антител как к нативной, так и к одноцепочечной, денатурированной молекуле ДНК в сыворотке крови, а также впервые изучен синдром эндогенной интоксикации по спектру молекул средней массы (МСМ) у пациентов в зависимости от особенностей течения заболевания. Исследование показало, что у 56% больных РС концентрация АТ к нативной ds-ДНК в крови выше физиологических, средняя концентрация АТ против денатурированной ss-ДНК выше была у 67% больных РС (рис. 1).

Физиологическому диапазону концентраций АТ против денатурированной ДНК соответствует 6% больных с РРС, 68% - с ВПРС и 86% пациентов - с ППРС, а физиологический диапазон концентраций АТ против нативной ДНК наблюдается у 73,3% больных при РРС, у 86% - при ВПРС и у 100% - при ППРС. Можно полагать, что у пациентов с РРС, более благоприятного типа те-

чения РС, в первую очередь происходит понижение наработки АТ против нативной ДНК. Из данных о среднем содержании антинуклеарных АТ видно, что уровень антител к нативной ДНК достоверно ниже, чем к денатурированной ДНК как в общей группе больных, так и в каждой из групп с различным типом течения РС. Это может указывать в пользу того, что клоны, продуцирующие АТ к нативной ДНК, способны быстрее элиминироваться, а клоны, продуцирующие АТ к продуктам дегградации ДНК – однотяжевым структурам, дольше сохраняются в организме.

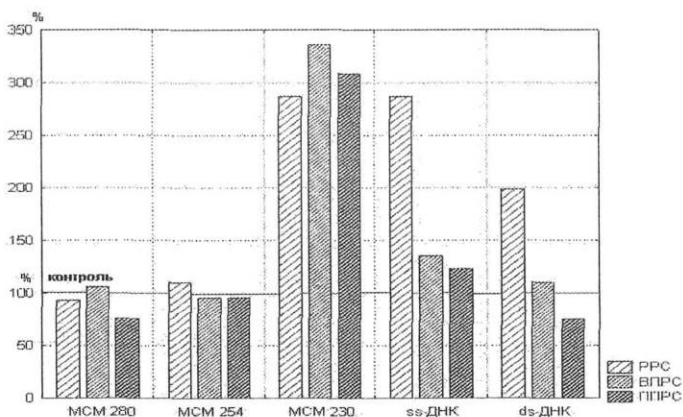


Рис. 1. Динамика уровня эндогенной интоксикации и содержания антител к ДНК при разных типах течения рассеянного склероза (в % от контроля).

В то же время установлена достоверная прямая корреляция между уровнями АТ к нативной и к денатурированной ДНК у всех больных с РС, коэффициент корреляции равен $r = 0,82$ (контрольная группа - $r = 0,63$). Внутри каждой группы с разным типом течения РС эти показатели также достоверно коррелировали между собой, коэффициенты корреляции: $r = 0,85$ – для группы РРС, $r = 0,61$ и $r = 0,66$ – для групп с ВПРС и ППРС, соответственно. Обнаруженные прямые корреляционные связи между содержанием АТ к нативной и денатурированной ДНК у больных при разных типах течения РС отражают патогенетическую взаимосвязь между развитием деструктивных, воспалительных процессов и активацией гуморального иммунного ответа, а также указывают на связь выработки АТ с основными типами и стадиями развития заболевания.

РС не одностадийный процесс [Steinman L., 2001], начальной воспалительной фазе при РРС соответствует высокий уровень пролиферации антител к ДНК, повышении активности ПОЛ, каталазы, ГП, СОД, Г6ФДГ и процессов эндотоксикоза. Затем, для более позднего периода заболевания, характерна нейродегенеративная фаза, напрямую связанная с разрушением нервных тканей организма [Lucchinetti C. et al., 2000; Bitsch A., Dressel A., 2004], сопровождающаяся усилением эндогенной интоксикации, характеризуемой спектром МСМ [Афанасьева А.Н., 2004; Карякина Е.В., Белова С.В., 2004].

Проделанное впервые определение спектра МСМ в сыворотке крови у больных РС, в зависимости от особенностей течения РС, оказалось информативным. Деструктивные процессы, лежащие в основе неспецифического синдрома эндогенной интоксикации, как правило, связаны с нарушениями структуры, функции мембран. Накопление МСМ является не только маркером эндотоксикации, но и фактором, усугубляющим течение патологического процесса. МСМ, приобретая роль вторичных токсинов, оказывают влияние на функции различных органов и систем [Аксенова В.М., Старкова А.В., 1998].

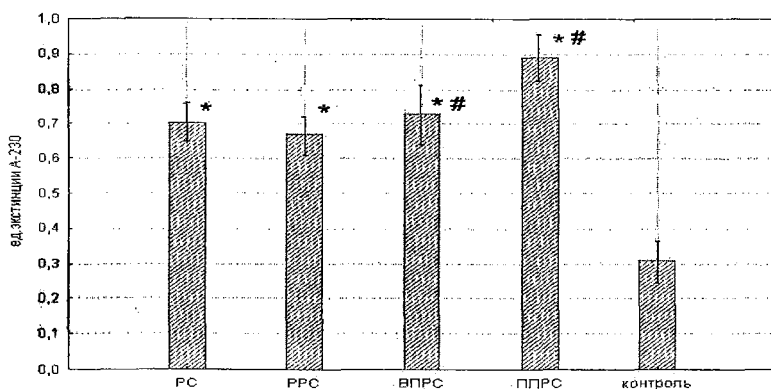


Рис. 2. Показатели нуклеарной фракции молекул средней массы (в единицах A₂₃₀) у больных рассеянным склерозом с различными типами течения.

Примечания: * – уровень достоверности различий между контрольной группой и группами больных при $p < 0,05$. # - уровень достоверности различий между группами пациентов.

В ходе исследования МСМ у пациентов с РС в зависимости от типа течения выявлено достоверное увеличение нуклеарной фракции E230 и нуклеарно-пептидного индекса во всех группах в сравнении с контролем, причем, степень увеличения соответствует повышению тяжести РС (рис. 2).

У пациентов с РРС уровень МСМ этой фракции в 2,2 раза, у пациентов с ВПРС – в 2,4 раза, у пациентов с ШРС – в 2,9 раз выше, чем в контроле.

У группы больных с ВПРС, в сравнении с РРС, нуклеарная фракция E₂₃₀ МСМ увеличена на 23%, а у группы ШРС – на 34%. В небольшой степени и статистически недостоверно изменяется токсическая E₂₅₄ и ароматическая фракция E₂₈₀. Увеличение нуклеарной фракции E₂₃₀, возможно, связано с накоплением в крови остатков нуклеиновых кислот в результате усиления апоптического разрушения клеток [Вострякова С.А. и др., 2008, Semenov D.V. et al., 2004], а также повышенного распада белков при РС. Все это подтверждает гибель клеток, а именно – олигодендроцитов, в результате ОС, играющего особо значимую роль в патогенезе РС [Besler H.T., Comoglu S., 2003; Koch M.W. et al., 2006]. Кроме того, используемые в фармакотерапии РС глюкокортикоиды оказывают выраженное воздействие на показатели гибели клеток, являясь индукторами апоптоза [Барышников А.Ю., Пишкин Ю.В., 2002]. Это, возможно, относится к переходу болезни в пейродегенеративную фазу, напрямую связанную с недостаточностью гематоэнцефалического барьера и разрушением нервных тканей организма [Steinman L., 2001; Lucchinetti C. et al., 2000].

Следует отметить, что увеличенная нуклеарная фракция МСМ при РС находится в соответствии с повышенным уровнем антител к ДНК. Повышение уровня МСМ и содержания антител к ДНК у больных РС, вероятно, обусловлено усилением их образования в тканях и патологией их элиминации из организма, либо сочетанием обоих механизмов.

Выработка АТ против нативной и денатурированной ДНК у больных РС зависит от индивидуальных особенностей пациентов и характера протекания РС. В целом, в период обострения у пациентов с РРС наблюдается тенденция

более выраженного повышения АТ против денатурированной ДНК, уровень которых заметно снижается в период ремиссии.

Таким образом, уровень перекисного окисления липидов и содержание окисленного глутатиона в эритроцитах у больных РС, находящихся в состоянии окислительного стресса, выходят за пределы физиологических. Высокая активность глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы позволяет делать вывод об активно и непрерывно идущих процессах ПОЛ в организме больных при всех типах течения РС. На начальных этапах заболевания отмечается мобилизация защитных систем организма в виде повышения активности ряда антиоксидантных ферментов в ответ на окислительный стресс. У больных с прогрессирующими типами течения РС при продолжающейся генерации активных форм кислорода наблюдается угнетение механизмов защиты, проявляющееся в неспособности большинства антиоксидантных ферментов сохранять оптимальную активность.

ВЫВОДЫ

1. Манифестация прогрессирующих форм рассеянного склероза выражена преимущественно в патологии двигательной сферы. При ППРС не отмечено поражения зрительного анализатора в дебюте заболевания. У больных с меньшей временной продолжительностью рассеянного склероза и незначительным неврологическим дефицитом возникали более частые обострения относительно длительно болеющих пациентов, имеющих значительные нарушения в различных системах организма. В группе пациентов с рассеянным склерозом имеется тенденция к наибольшему усугублению неврологической дисфункции в период от 5 до 10 лет от начала болезни.

2. Выявлена активация свободнорадикального окисления липидов, проявляющаяся повышением уровня промежуточного продукта ПОЛ - малонового диальдегида как в плазме крови, так и в эритроцитах для всех типов течения рассеянного склероза.

3. При рассеянном склерозе имеется взаимосвязь показателей эндогенной антиоксидантной защиты с типом течения и стадией патологического процесса.

Отмечено повышение активности глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы наряду со снижением уровня ферментов, участвующих в метаболизме глутатиона: глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в крови пациентов по сравнению с контролем. Отличительной особенностью антиоксидантных систем в эритроцитах является разнонаправленность изменения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы: повышение при РРС на 81,1% и снижение при ВПРС на 26,7 %.

4. Установлено различие уровней антител к нативной и денатурированной одноцепочечной молекулам ДНК в сыворотке крови в зависимости от стадии и типа течения рассеянного склероза. Количество антител к ДНК в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом повышено относительно группы контроля. При прогрессирующих типах течения (ВПРС и ППРС) степень повышения титра антител резко убывает. Определена статистически достоверная прямая корреляция между уровнями АТ к нативной и к денатурированной ДНК у всех больных с рассеянным склерозом (коэффициент корреляции равен $r = 0,82$, $p < 0,05$, у здоровых лиц - $r = 0,63$, $p < 0,05$). Внутри каждой группы с разным типом течения рассеянного склероза эти показатели также достоверно коррелировали между собой (коэффициенты корреляции: $r = 0,85$ – для группы РРС, $r = 0,61$ и $r = 0,66$ – для групп с ВПРС и ППРС, соответственно, $p < 0,05$).

5. При рассеянном склерозе имеется достоверное увеличение нуклеарной фракции E_{230} молекул средней массы, образующихся при распаде эндогенных белков, относительно группы контроля. У пациентов с РРС уровень олигопептидов данной фракции повышен в 2,2 раза, при ВПРС – в 2,4 и при ППРС – в 2,9 раз превышает контрольные показатели.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При наблюдении за пациентами с рассеянным склерозом следует уделять внимание признакам манифестации и длительности заболевания. Первые симптомы болезни часто могут указывать на тип клинического течения и темп прогрессирования рассеянного склероза. Временной период заболевания, находящийся преимущественно в пределах от 5 до 10 лет, определяет прогноз каче-

ства и длительности жизни, поскольку именно в первые 10 лет болезни происходит особенно выраженное изменение функций различных систем организма.

2. При обследовании больных РС следует учитывать результаты лабораторного обследования, включающего оценку параметров эндогенной интоксикации по спектру МСМ. Это позволит установить степень метаболических нарушений у пациентов с РС и определить прогноз течения заболевания.

3. Определение уровня глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах периферической крови в совокупности с анализом клинических проявлений заболевания позволит в сложных атипичных случаях провести дифференцирование различных типов течения рассеянного склероза.

4. В качестве направлений фармакологической коррекции для защиты от повреждающего воздействия активных продуктов свободнорадикального окисления патогенетически оправдано использование препаратов с антиоксидантным действием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Особенности эндогенной интоксикации при рассеянном склерозе // Вопросы интегративной физиологии. - Красноярск, ООО «Версо», 2007. Вып. 2. С. 192-197.
2. Логинов В.Н., Кротенко Н.В., Ромацько Ю.О. и др. Среднмолекулярные пептиды при психических и неврологических заболеваниях //Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: материалы науч.-практ. конф. СПб, 2007. С. 159-160.
3. Смирнова Л.П., Кротенко Н.В., Логинов В.Н. и др. Сравнительная активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах больных шизофренией и рассеянным склерозом // Актуальные вопросы психиатрии и наркологии - Томск, 2007. Вып. 13. С. 108-110.
4. Смирнова Л.П., Кротенко Н.В., Логинов В.Н. и др. Уровень активности антиоксидантных ферментов у больных с невротическими расстройствами // Вестник Томского государственного университета. 2007. №300 (II). С. 233-236.

5. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Спектр среднелекулярных пептидов в динамике фармакотерапии рассеянного склероза // Нейроиммунология. 2007. Т. 5. №2. С. 6-7.
6. Вострякова С.А., Кротенко Н.В., Алифирова В.М. и др. Уровень дегидроэпиандростерона у больных рассеянным склерозом // Сибирский консилиум. 2007. №6 (61). С. 76-77.
7. Смирнова Л.П., Кротенко Н.В., Логинов В.Н. и др. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах больных психическими и неврологическими расстройствами // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2008. №1 (48). С. 133-135.
8. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Нарушение биохимических показателей периферической крови у пациентов с рассеянным склерозом // Бюллетень Сибирской медицины. 2008. Т. 7. Приложение 1. С. 237-245.
9. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Окислительный стресс – характерная особенность патогенеза рассеянного склероза // Бюллетень Сибирской медицины, 2008. Т. 7. №5. С. 208-214.
10. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Биохимические особенности окислительного стресса при рассеянном склерозе // Актуальные вопросы неврологии: материалы VI межрегион. науч.-практ. конф., посвящённой смежным вопросам неврологии и психиатрии. Новосибирск; Томск, 2009. С. 98.
11. Krotenko N., Alifirova V., Ivanova S. Study oxidant and antioxidant systems in multiple sclerosis // The World J. of Biol. Psych. Abstracts of the 9th World Congress of Biological Psychiatry, 2009, Paris, France. P. 416.
12. Krotenko N., Alifirova V., Ivanova S., Smirnova L.P. Level of oxidative stress in patients with multiple sclerosis in process of therapy // The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 2009. V. 19. Supplement 3. P. 629.
13. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Параметры антиоксидантной защиты при рассеянном склерозе // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2009. Т. 109. Приложение – Рассеянный склероз. №7. С. 53-57.
14. Кротенко Н.В., Смирнова Л.П., Алифирова В.М. и др. Состояние окислительного стресса и его роль в механизме развития и терапии рассеянного склероза // VI Международной конференции «Молекулярная медицина и безопасность». Москва, 2009. С. 121-123.
15. Krotenko N.V., Smirnova L.P., Alifirova V.M. Pro- and antioxidant mechanisms in patients in different clinical forms of multiple sclerosis current in treatment

//The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 2010. V. 20. Supplement 3. P. 566.

16. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. Особенности параметров перекисного окисления липидов и факторов антиперекисной защиты при рассеянном склерозе //V Международная научная конференция «Психофизиологические и висцеральные функции в норме и патологии», Киев, Украина, 2010. С. 103-104.
17. Кротенко Н.В., Смирнова Л.П., Кротенко Н.М. и др. Изменение уровня окислительного стресса у пациентов с ремиттирующей и вторично-прогрессирующей формами рассеянного склероза в динамике терапии //Неврологический журнал. 2010. №6. С. 26-29.
19. Иванова С.А., Алифирова В.М., Лебедева В.Ф., Кротенко Н.В. и др. Клинико-диагностическое значение молекул средней массы у больных психическими и неврологическими расстройствами: пособие для врачей. Томск, 2010. 33 с.
20. Smirnova L.P., Krotenko N.V., Grichko E.V. et al. The State of the Antioxidant System during Therapy of Patients with Multiple Sclerosis //Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2011. V. 5. № 1. P. 76-80.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОС	– антиоксидантная система
АОФ	– антиоксидантные ферменты
АФК	– активные формы кислорода
Г6ФДФ	– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГП	– глутатионпероксидаза
ГР	– глутатионредуктаза
ГТ	– глутатионтрансфераза
МДА	– малоновый диальдегид
МСМ	– молекулы средней массы
НАДФН	– никотинамиддинуклеотидфосфат восстановленный
ОС	– окислительный стресс
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
РС	– рассеянный склероз
РРС	– ремиттирующий рассеянный склероз
ВПРС	– вторично-прогрессирующий рассеянный склероз
ППРС	– первично-прогрессирующий рассеянный склероз
СОД	– супероксиддисмутаза
EDSS	Expanded Disability Status Scale – расширенная шкала степени инвалидизации

Подписано к печати 21.03.11. Бумага офсетная.
Печать RISO. Формат 60x84/16. Тираж 70 экз. Заказ № 38-0347
Центр ризографии и копирования. Ч/П Тисленко О.В.
Св-во №14.263 от 21.01.2002 г., пр. Ленина, 41, оф. № 7а.