

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.17:577.15: 616.831-005.4

© Коллектив авторов

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ИНСУЛЬТАХ И ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Л.С. Колесниченко¹, В.И. Кулинский^{2}, В.В. Шпрах³, В.В. Бардымов³,
Н.В. Верлан⁴, Л.П. Губина¹, Г.А. Пенсионерова¹, М.П. Сергеева¹,
Л.М. Станевич¹, Г.Т. Филиппова¹*

Кафедры ¹бионеоорганической и биоорганической химии и ²биохимии
Иркутского государственного медицинского университета; факс: (395)224-3825;
эл. почта: kulinsky@pp.irkutsk.ru.

Кафедры ³неврологии и нейрохирургии и ⁴клинической фармакологии
Иркутского государственного института усовершенствования врачей.

При дисциркуляторной энцефалопатии и легкой степени ишемического инсульта изменения компонентов обмена глутатиона единичны. При ишемическом инсульте средней и тяжелой степени выявлены более существенные сдвиги. Изменения обмена глутатиона выражены и при геморрагическом инсульте. При этом наиболее четко прослеживалось увеличение активностей глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, реже – глутатионредуктазы и концентрации GSH. Достоверное увеличение активности ферментов отсутствовало при начале лечения после 3 суток и у тяжелых больных, в дальнейшем умерших. Система глутатиона, по-видимому важна для толерантности к ишемии головного мозга.

Ключевые слова: система глутатиона, инсульт, дисциркуляторная энцефалопатия.

ВВЕДЕНИЕ. Глутатион и ферменты его обмена играют важную роль как в метаболизме и функциях, так и в толерантности головного мозга к ишемии [1, 2]. В эксперименте предшественники GSH – его моноэтиловый эфир [3] и N-ацетилцистеин [4] увеличивали концентрацию GSH в клетках, уменьшали размер инфаркта [3, 4] и улучшали исходы инсульта [4]. Получены данные о значении GSH митохондрий для толерантности к ишемии мозга [5]. Однако истощение GSH не снижало, а увеличивало толерантность к глобальной ишемии (см. [6] и ссылки в ней). Предварительная сверхэкспрессия глутатионпероксидазы (ГПО) защищала от инсульта и отека [7, 8] и ослабляла неврологический дефицит [7], а при нокауте ГПО объем инфаркта возрастал [9]. В отличие от молекулярно-генетических методов, лечение экзогенной ГПО оказалось неэффективным [10], а антиоксидант эбселен, частичный миметик ГПО, не влиял на её активность и устранял защиту мозга ишемическим preconditionированием [11]. В клинике уже в первые часы в крови увеличивалась концентрация GSH, а через 1 сутки и ГПО, при этом активность последней тесно и отрицательно коррелировала с оценкой по шкале инсульта NIHSS [12]. У части детей с семейным инсультом активность ГПО плазмы значительно снижена [13]. В популяционном исследовании было показано, что риск инфаркта мозга повышался при низкой концентрации GSH в плазме [14]. Авторы приведённых работ исследовали только 1-2 показателя, не позволяя оценить состояние системы глутатиона в целом.

* - адресат для переписки

Целью нашей работы было комплексное исследование концентрации глутатиона и активности основных ферментов его метаболизма в плазме крови и эритроцитах при нарушениях мозгового кровообращения разной степени тяжести.

МЕТОДИКА. Проведено исследование 135 человек, из них 25 с дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ), 12 с геморрагическим инсультом (ГИ), 75 с ишемическим инсультом (ИИ), 23 человека (без признаков нарушения мозгового кровотока) составили контрольную группу. Средний возраст в контроле – 53,4, больных – 64,9 года. Диагностика основывалась на клинико-лабораторном и функциональном обследовании. Степень тяжести оценивали по шкале инсульта Национального института здоровья США (NIHSS). При поступлении в больницу у пациентов с ИИ легкой степени средний балл равен $4,6 \pm 0,5$ ($n = 9$), при средней тяжести – $8,9 \pm 0,7$ ($n = 32$), у тяжелых – $15,4 \pm 1,8$ ($n = 34$). GSH и ферменты его метаболизма ГПО, глутатионтрансферазу (ГТ) и глутатионредуктазу (ГР) определяли стандартными спектрофотометрическими методами, как описано ранее [15]. Серии сравнивали по дисперсиям (критерий F) и средним (критерий-t Стьюдента). Описаны только статистически значимые сдвиги ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При ДЭ выявлено только выраженное увеличение активности ГТ в эритроцитах и плазме (рис. 1). В отличие от этого при ИИ в эритроцитах и плазме резко или выражено возрастала активность ГПО, в эритроцитах – ГТ, в плазме активность ГР и концентрация GSH. При ГИ в плазме резко увеличивались активности ГР и особенно ГПО; меньшая частота значимых изменений может быть связана с малым размером группы. Обращает внимание, что качественно идентичные сдвиги при двух заболеваниях наблюдались только при обоих типах инсульта – ГПО и ГР плазмы, при ДЭ и ИИ – ГТ эритроцитов, но при всех трёх заболеваниях совпадения не было ни разу. Это свидетельствует о своеобразии реакций системы глутатиона на различные типы нарушений мозгового кровообращения.

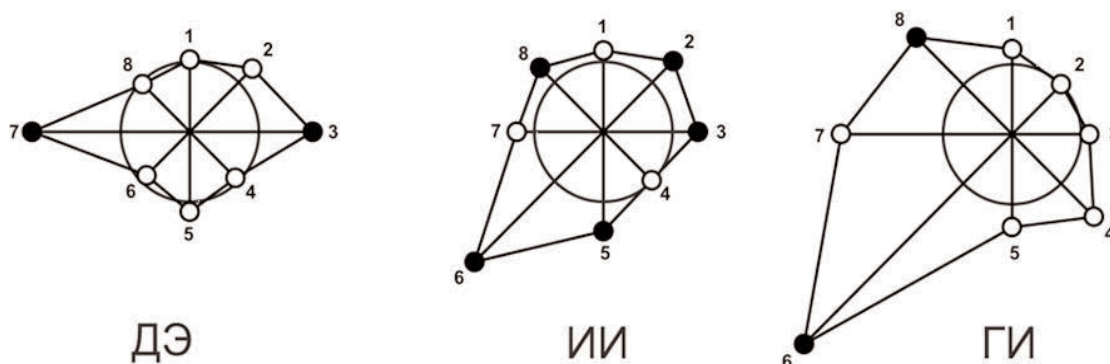


Рисунок 1.

Сдвиги в системе глутатиона при нарушениях мозгового кровотока при поступлении в больницу.

Обозначения: ДЭ – дисциркуляторная энцефалопатия ($n = 25$), ИИ – ишемический инсульт ($n = 75$), ГИ – геморрагический инсульт ($n = 12$).

На всех рисунках значения показателей в контроле приняты за 100% и изображены в виде радиуса окружности. Изменения у больных (выражены в процентах к контролю) нарушают симметричность диаграммы: увеличения показателей изображаются в виде «лучей», выступающих за пределы окружности, снижение показателей – в виде впадин.

Чёрные кружки – $p < 0,05$, светлые – $p > 0,05$; 1-4 – эритроциты, 5-8 – плазма крови; 1,5 – GSH, 2,6 – глутатионпероксидаза (ГПО), 3,7 – глутатионтрансфераза (ГТ), 4,8 – глутатионредуктаза (ГР).

При легкой степени тяжести ИИ единственным отличием от контроля было значительное увеличение активности ГПО в плазме крови (таблица). Для средней степени тяжести характерно увеличение в плазме крови и эритроцитах активности ГТ, только в плазме – концентрации GSH и активности ГПО. При тяжелой степени как в плазме, так и в эритроцитах возрастала активность ГПО, в эритроцитах – концентрация GSH, в плазме – активность ГР (рис. 2) В каждой из этих двух групп из исследованных нами 8 биохимических показателей значимо увеличивалась половина, в большинстве случаев – в 1,5-2 раза.

Таблица. Система глутатиона при ишемическом инсульте.

Степень тяжести	n	GSH	ГПО	ГТ	ГР
Эритроциты					
Контроль	23	2,27±0,20	27,4±3,52	4,44±0,44	2,76±0,30
Легкая	9	2,08±0,19	36,2±6,13	4,95±0,64	3,09±0,59
Средняя	32	2,47±0,22	35,2±3,11	6,99±0,77 ^б	2,37±0,19
Тяжелая	34	2,78±0,02 ^а	44,2±5,50 ^а	5,79±0,55	2,65±0,24
Плазма					
Контроль	23	21,7±3,2	2,64±0,33	1,02±0,11	0,38±0,03
Легкая	9	25,1±3,0	6,77±1,31 ^б	0,84±0,25	0,32±0,03
Средняя	32	31,9±3,8 ^а	4,40±0,68 ^а	1,47±0,19 ^а	0,45±0,04
Тяжелая	34	31,6±4,9	9,49±1,67 ^а	1,16±0,18	0,54±0,06 ^а

Примечания. Концентрация GSH в эритроцитах - в мкмоль/мл, в плазме - в нмоль/мл; активность ферментов - в нмоль/мин на 1 мг белка. Значимость различий с контролем: а - $p < 0,05$, б - $p < 0,01$, в - $p < 0,001$.

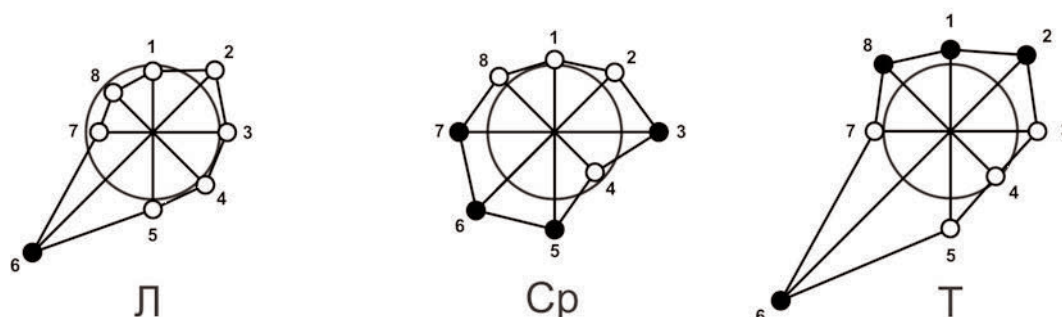


Рисунок 2.

Система глутатиона при ишемическом инсульте разной степени тяжести.
Л– лёгкая степень тяжести (n = 9), Ср – средняя степень тяжести (n = 32),
Т – тяжелая степень (n = 34).

СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА КРОВИ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

У пациентов средней степени при раннем поступлении в больницу и начале лечения до 3 суток активности ГПО и ГТ в плазме крови и эритроцитах закономерно увеличены, а при более поздней госпитализации этого не наблюдалось и единственным изменением было увеличение GSH в плазме крови (рис. 3). При инсульте тяжелой степени у выживших больных в эритроцитах и особенно в плазме происходило накопление GSH и резкое увеличение активности ГПО, повышение активности ГР в плазме. У тяжелых больных, в дальнейшем умерших (через 2-25 суток после исследования крови, медиана – 9 суток), все эти изменения отсутствовали (рис. 4). Не исключено, что это различие можно будет использовать как прогностический тест. В пользу этого свидетельствует значимость различий у выживших не только с контролем, но и с умершими позднее. Наши данные согласуются с тем, что активация ГР при хорошем прогнозе больше, чем при плохом (другие реакции системы глутатиона авторы не изучали) [16].

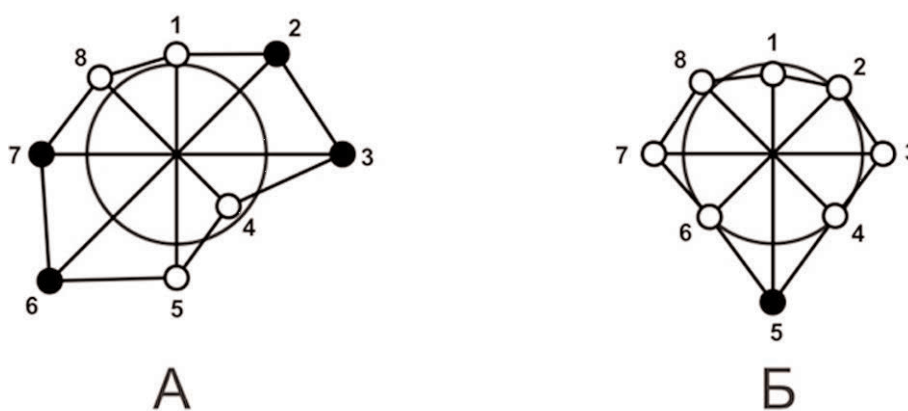


Рисунок 3.

Система глутатиона при ишемическом инсульте средней степени.
А – госпитализация и начало лечения в первые 3 суток (n = 19),
Б – госпитализация и начало лечения после 3 суток (n = 13).

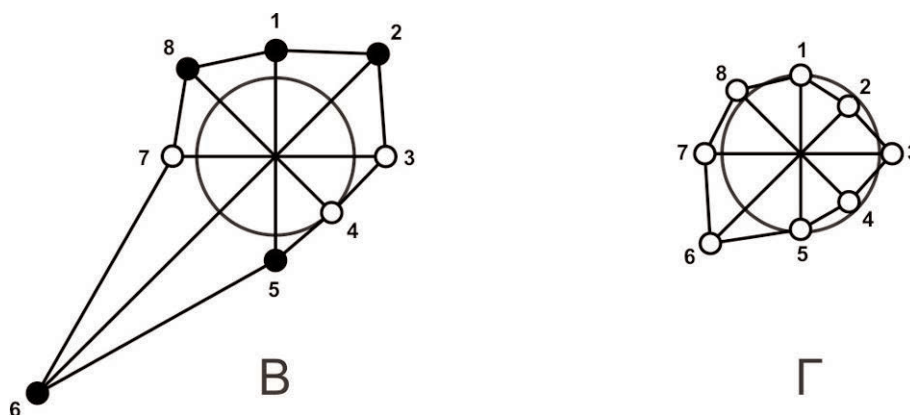


Рисунок 4.

Система глутатиона при ишемическом инсульте тяжелой степени при поступлении в больницу.
В – выжившие пациенты (n = 24), Г – пациенты, умершие через 2-25 суток после исследования крови (медиана – 9 суток; n = 10).

Обращает внимание, что независимо от остроты и тяжести патологического процесса сдвиги всегда заключались в возрастании показателей – увеличении активности ферментов и концентрации GSH. Это означает, что система глутатиона закономерно переходила на более высокий уровень функционирования. Оценить преобладание быстрых (активация) или длительных (экспрессия) механизмов, внутриклеточных или межорганных процессов в настоящее время невозможно, особенно в эритроцитах. При инсульте источником глутатиона и ферментов его метаболизма в плазме могут быть поврежденные нейроны и/или глия. Это связано с тем, что инсульт значительно увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера [17]. Вероятно, это объясняет большую частоту (7 из 11) изменений в плазме.

Наиболее значительно увеличивались ГПО и затем ГТ. Активность ГПО возрастала при всех трех степенях тяжести ИИ и при ГИ, и эти сдвиги были наиболее выражены (в 1,7-4,3 раза). В литературе данных по ГТ при инсульте мы не обнаружили, но она также является важным антиоксидантным ферментом, который обезвреживает многие окисленные метаболиты путем как восстановления, так и конъюгации и, кроме того, восстанавливает окисленные нуклеотиды в ДНК [18, 19]. Активация вспомогательного фермента ГР наблюдалась намного реже, чем ГПО и ГТ, так как его активность как в клетках, так и в плазме намного меньше (см. табл.). Обращает внимание, что высокая активность в плазме и эритроцитах ферментов метаболизма глутатиона – ГПО и ГТ не приводит к снижению его концентрации, а иногда GSH даже накапливается. Очевидно, это объясняется не столько восстановлением GSSG, сколько увеличенным синтезом GSH в клетках, включая эритроциты, а для плазмы – более легким, по сравнению с белками, выходом в кровоток глутатиона из поврежденных клеток.

С патофизиологических позиций увеличенное функционирование системы глутатиона противостоит оксидативному стрессу, играющему важную роль в развитии инсульта [17]. Наиболее частый биохимический сдвиг – увеличение активности основных антиоксидантных ферментов ГПО и ГТ – защищает от активных форм кислорода и продуктов пероксидации, позволяет в определенной степени восстановить равновесие и улучшить редокс-регуляцию. В пользу этого свидетельствуют наши данные об активации при средней степени тяжести ГПО и ГТ в эритроцитах и плазме при относительно раннем, но не позднем начале лечения. При тяжелой степени инсульта так же можно интерпретировать значительную активацию ряда показателей у выживших и полную ареактивность у умерших пациентов. Вероятно, без защитных реакций системы глутатиона выживание при тяжелом инсульте невозможно. В этом плане самые резкие сдвиги в обмене глутатиона – увеличение в плазме в 4,2 раза активности ГПО при тяжелом ИИ у выживших больных и в 4,3 раза при ГИ могут рассматриваться как максимальные защитные реакции. При ИИ средней степени ГПО увеличивалась только в 1,6 раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В отличие от дисциркуляторной энцефалопатии и легкого инсульта при ишемических инсультах средней и тяжелой степени и геморрагическом инсульте возникает выраженная и широкая стимуляция системы глутатиона. Активация антиоксидантных ферментов и/или увеличение концентрации GSH в остром периоде важны для защиты от опасного оксидативного стресса и восстановления баланса оксидантов и антиоксидантов. Ареактивность системы глутатиона при позднем начале лечения инсульта средней тяжести и особенно у части больных инсультом тяжелой степени может стать фатальной. Наши результаты свидетельствуют в пользу важного значения обмена глутатиона для толерантности к инульту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А. (1995) Биохимия, **60**, 1536-1542; (2001) Сорос. образоват. журн., **7**, № 4, 21-28.
2. Dringen R. (2000) Progress in Neurobiol., **62**, 649-671.
3. Anderson M.F., Nilsson M., Eriksson P.S., Sims N.R. (2004) Neurosci. Lett., **354**, 163-165.
4. Khan M., Sekhon B., Jatana M., Giri S., Gilg A.G., Sekhon C., Singh I., Singh A.K. (2004) J. Neurosci. Res., **76**, 519-527.
5. Sims N.R., Nilsson M., Muyderman H. (2004) J. Bioenerg. Biomembr., **36**, 329-333.
6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., Ковтун В.Ю., Сотникова Г. В. (2003) Биомед. химия, **49**, 424-433.
7. Weisbrot-Lefkowitz M., Reuhl K., Perry B., Chan P.H., Inouye M., Miroshnichenko O. (1998) Brain Res. Mol. Brain Res., **53**, 333-338.
8. Hoehn B., Yenari N.A., Sapolsky R.M., Steinberg G.K. (2003) Stroke, **34**, 2489-2494.
9. Crack P.G., Taylor J.M., Ali U., Mansel A., Hertzog P.J. (2006) Stroke, **37**, 1533-1538.
10. Yano T., Ushijima K., Terasaki, H. (1998) Resuscitation, **39**, 91-98.
11. Puisieux F., Deplanque D., Bulckaen H., Maboudou P., Gele P., Lhermitte M., Lebuffe G., Bordet R. (2004) Brain Res., **1027**, 30-37.
12. Zimmermann C., Winnefeld K., Streck S., Roskos M., Haberl, R.L. (2004) Eur. Neurol., **51**, 157-161.
13. Kenet G., Freedman. J., Shenkman B., Regina E., Brok-Simoni F., Holzman F., Vavva F., Brand N., Michelson A., Trolliet M., Loscalzo J., Inbal A. (1999) Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol., **19**, 2017-2023.
14. Shimizu H., Kiyohara Y., Kato I., Kitazono T., Tanizaki Y., Kubo M., Ueno H., Ibayashi S., Fujishima M., Iida M. (2004) Stroke, **35**, 2072-2077.
15. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Сотникова Г.В., Ковтун В.Ю. (2003) Биохимия, **68**, 656-663.
16. Aydin M., Gencer M., Cetinkaya Y., Ozkok E., Ozbek Z., Kilik G., Orken C., Toreli H., Kara I. (2006) IUBMB life, **58**, 165-172.
17. Гусев Е.И., Скворцова В.И. (2001) Ишемия головного мозга, Медицина, М.
18. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1993) Успехи соврем. биол., **113**, 107-122.
19. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **45**, 51-88.

Поступила: 08. 11. 2006.

**GLUTATHIONE SYSTEM IN ERYTHROCYTE AND BLOOD PLASMA IN STROKES
AND DYSCIRCULATORY ENCEPHALOPATHY**

***L.S. Kolesnichenko¹, V.I. Kulinsky², V.V. Shprakh³, V.V. Bardymov³, N.V. Verlan⁴, L.P. Gubina¹,
G.A. Pensionerova¹, M.P. Sergeeva¹, L.M. Stanevich¹, G.T. Philippova¹***

¹Departments of Bioinorganic and Bioorganic Chemistry and ²Biochemistry, Irkutsk State Medical University, 664047, P.O. Box 85, Russia; fax (395)224-3825; e-mail: kulinsky@pp.irkutsk.ru

³Departments of Neurology and Neurosurgery and ⁴Clinical Pharmacology, Irkutsk State Institute of Physician Training

In dyscirculatory encephalopathy and moderate ischemic stroke there are single changes of components of glutathione metabolism. In moderate and severe ischemic stroke frequent and considerable changes have been revealed. Changes in hemorrhagic stroke are also expressed. An increase of activities of glutathione peroxidase and glutathione transferase is the most typical, rarely the increase of glutathione reductase and GSH is observed. The increase of enzymes activity was absent at the delayed onset of treatment (more than 3 days) and in severe cases patients who died later. Glutathione system is important in the tolerance to cerebral ischemia.

Key words: glutathione system, stroke, dyscirculatory encephalopathy.