

УДК 616.832-004.2 : 577.158.1

© Коллектив авторов

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ В ДИНАМИКЕ ТЕРАПИИ

Л.П. Смирнова^{1}, Н.В. Кротенко², Е.В. Гришко¹, Н.М. Кротенко²,
В.М. Алифирова², С.А. Иванова¹*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт психического здоровья СО РАМН 634014, Томск, пос. Сосновый бор, ул. Алеутская, 4; тел.: 8(382-2)72-43-79; факс: 8 (382-2)72-44-25; эл. почта: lpsmirnova@yandex.ru

²Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Томск

Изучали активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), и супероксиддисмутазы (СОД), а также количество малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и общую антиоксидантную активность сыворотки крови у больных разными формами рассеянного склероза. Исследование периферической крови больных проводили в первый день при поступлении в клиническое отделение и после стандартного курса терапии копаксоном. У всех обследованных больных на протяжении всего наблюдения сохраняется высокой уровень МДА и активности ГП в эритроцитах по сравнению с контрольной группой. Остальные изученные ферменты эритроцитов и общая антиокислительная активность сыворотки крови в основном имеют слабую положительную динамику у больных с ремитирующим типом течения рассеянного склероза. Патологическое снижение активности антиоксидантной системы у больных с вторично прогрессирующим типом течения носит более выраженный характер и не изменяется после проведенной терапии, что согласуется с более тяжелой клинической картиной заболевания.

Ключевые слова: окислительный стресс, антиоксидантные ферменты, рассеянный склероз.

ВВЕДЕНИЕ. Рассеянный склероз (РС) – прогрессирующее воспалительное заболевание, при котором повреждается миелиновая оболочка нервных волокон, что приводит к постепенной утрате различных функций нервной системы. В настоящее время предполагается, что в патогенезе РС активно проявляет себя тандем двух взаимосвязанных событий: иммунопатологического и оксидантного стресса (ОС), получивший название – иммунно-метаболический механизм [1-5]. При РС происходит активация Т-клеток и всех составляющих гуморального иммунитета, увеличивается функциональная активность макрофагов. Следствием этого является активация неспецифических механизмов фагоцитоза и, как результат, – развитие ОС в нервных и глиальных клетках, ведущее за собой разрушение миелиновой оболочки аксонов и уменьшение их числа [1, 2, 4-6].

Активация свободнорадикальных процессов – универсальный повреждающий механизм клеточных структур. Нарушение баланса между продукцией свободных радикалов и механизмом антиоксидантного контроля над их содержанием

* - адресат для переписки

и приводит к развитию ОС. Для регуляции интенсивности свободно-радикальных процессов и контроля над уровнем окислительных повреждений существует антиоксидантная система (АОС) [7, 8]. Несмотря на то, что во многих работах показано свободно-радикальное повреждение нейронов при РС, в настоящее время мало данных, отражающих эти процессы в других органах и, прежде всего, в частности в эритроцитах, активно участвующих в поддержании антиоксидантного гомеостаза организма.

Тип течения РС, длительность ремиссий, обострений, ответ на лечение, избирательность возникновения бляшек рассеянного склероза в мозге чрезвычайно индивидуальны. Варианты его течения разнообразны – на начальных этапах болезни чаще отмечается ремиттирующее течение, которое с течением времени может перейти во вторично прогрессирующее; реже – первично прогрессирующий тип течения заболевания. Биохимические особенности всех этих форм рассеянного склероза изучены слабо. Изучение уровня окислительного стресса в эритроцитах периферической крови больных РС с разными клиническими формами и стадиями заболевания позволит внести вклад в понимание патогенетических механизмов развития разных форм РС. Также до сих пор актуален поиск биохимических маркеров тяжести патологического процесса, особенно на ранних стадиях его развития.

Целью данной работы явилось исследование уровня МДА и антиоксидантных свойств крови больных с разными клиническими формами рассеянного склероза в ходе проводимой терапии.

МЕТОДИКА. Комплексное клинико-биохимическое обследование проведено по общепринятой схеме у 29 больных с диагнозом РС, установленным в соответствии с международными критериями Мак-Дональда (2005) [9]. Группа сравнения состояла из 31 здорового донора, проживающих в г. Томске, со средним возрастом 31,9 года, аналогично возрасту пациентов с рассеянным склерозом. В ходе исследований определяли общую антиоксидантную активность сыворотки крови, активность антиоксидантных ферментов (АОФ) и содержание малонового диальдегида (МДА) в гемолизате эритроцитов в нескольких точках: до начала терапии, а также через 3 и 6 месяцев после лечения.

Кровь из локтевой вены, стабилизированную гепарином, центрифугировали, осаждая эритроциты, которые впоследствии подвергались гемолизу. Состояние ОС оценивали по содержанию в эритроцитах ТБК-связывающих веществ в пересчёте на концентрацию малонового диальдегида [10]. Для определения активности антиоксидантных ферментов гемолизат центрифугировали при 30000 g в течение 45 минут при 4°C (ультрацентрифуга L8-70M “Beckman”). В полученном супернатанте, спектрофотометрически определяли активность АОФ. Глутатионпероксидазу определяли по окислению NADPH в сопряжённой глутатионредуктазной реакции восстановления гидроперекиси третичного бутила. В среду инкубации, содержащую 0,1 mM NADPH, 1 mM ЭДТА и 0,125 единиц активности (U) глутатионредуктазы в 50 mM фосфатном буфере pH 7,4, добавляли гемолизат эритроцитов и гидропероксид третичного бутила до конечной концентрации 0,2 mM. В течение 5 минут регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм [11]. Глутатионредуктазу исследовали по окислению NADPH в реакции восстановления окисленного глутатиона. В среду инкубации, содержащую 0,1 mM NADPH и 1 mM ЭДТА в 50 mM фосфатном буфере pH 7,4, добавляли гемолизат и окисленный глутатион до конечной концентрации 1 mM и в течение 5 минут регистрировали изменение оптической плотности при 340 нм [12]. Глутатион-S-трансферазу определяли по образованию хромогенных конъюгатов глутатиона с 1-хлоро-2,4-динитробензолом. В среду инкубации, содержащую 1 mM восстановленного глутатиона в 50 mM фосфатном буфере pH 7,0, добавляли 8,1% раствор 1-хлоро-2,4-динитробензола в этаноле до конечной концентрации 1 mM и измеряли изменение оптической плотности при длине волны 340 нм. После добавления гемолизата регистрировали скорость ферментативной

реакции в течение 5 минут [13]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы измеряли по изменению концентрации восстановленного NADP при добавлении исследуемого образца. В среду инкубации ФБ 0,1М рН 7,5; $MgCl_2$ 0,1 М; NADP 15 мМ; Г-6-Р Na 40 мМ. На фосфатном буфере ФБ (рН 7,5 0,1 М) добавляли гемолизат и регистрировали изменение оптической плотности при длине волны поглощения 340 нм в течение 5-7 минут [14]. Активность СОД определяли по скорости ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в системе ксантин-ксантиноксидаза. Реакционная смесь содержала растворы карбоната натрия – 50 мМ, ЭДТА – 0,1 мМ, НСТ – 37,5 мкМ в 50 мМ фосфатном буфере рН 10,2 и 0,1 мМ раствор ксантина в 0,5 М NaOH. После добавления ксантиноксидазы (0,05 единиц активности на пробу) регистрировали изменение оптической плотности 3-5 минут. Затем добавляли гемолизат, содержащий СОД и также регистрировали изменение оптической плотности во времени. Расчёт активности СОД проводили, используя коэффициент молекулярной экстинкции образующегося формазана $E=3,0 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}$ [15]. Расчёт активности всех ферментов проводили на мг белка. Содержание белка в исследуемом образце определяли по методу Бредфорда [16]. Единица ферментативной активности (U) соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата в 1 мин при 25°C. Определение общей антиоксидантной активности сыворотки крови заключалось в её способности тушить хемилюминесценцию в модельной системе: гемоглобин – перекись водорода – люминол. Интенсивность хемилюминесценции обратно пропорциональна активности АОС [17].

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica, версия 6.0 для Windows. Достоверность различий определяли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Лечение пациентов с РС проводилось в неврологической клинике ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава. Пациенты получали лечение иммуномодулирующими препаратами: копаксон, ребиф и бетаферон. Для объективизации тяжести неврологического дефицита применяли шкалу J. Kurtzke [9] с определением степени инвалидизации и скорости прогрессирования патологии (EDSS/длительность заболевания).

По ряду специфических признаков течения болезни пациенты были разделены на две подгруппы: 20 человек с ремиттирующим типом течения (РРС) и 9 человек со вторично прогрессирующим (ВПРС).

РРС характеризуется эпизодическими обострениями с полным или неполным клиническим восстановлением и фазой стабилизации клинической картины между эксацербациями. В 75-85% случаев заболевание вначале протекает именно так. Клинические ремиссии не свидетельствуют о затухании патологического процесса, так как его активность может сохраняться и при отсутствии клинических проявлений. При наличии в анамнезе достоверных данных об обострениях и ремиссиях, 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 $26\pm4,5$ лет, а длительность болезни $11\pm2,8$ лет; средний показатель степени тяжести больных – 2,6 балла при скорости прогрессирования – 0,5.

ВПРС характеризуется постепенным нарастанием неврологических расстройств с периодами обострений в течение заболевания или без них у пациентов, ранее имевших РРС. Более чем у половины больных РРС через 10 лет болезнь трансформируется в ВПРС, а через 25 лет почти все пациенты данной группы имеют ВПРС, эффективность терапии при котором невысока. ВПРС определялся при наличии в анамнезе четких сведений о перенесённых 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). Балл по шкале инвалидности EDSS составил 3,87; скорость прогрессирования – 0,86.

В результате исследований у пациентов с РС в гемолизате эритроцитов обнаружено увеличение содержания МДА в эритроцитах пациентов с разными клиническими типами течения РС по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$) (рис. 1) У всех больных РС на протяжении всего обследования сохраняется высокой уровень ПОЛ, выражающийся в повышенном в 1,6-2,2 раза количестве МДА в эритроцитах в сравнении с контрольной группой ($39,5 \pm 2,61$ мкМ). Исключение составили больные ВПРС после 3 месячного лечения, у которых этот показатель снизился до значений близких к контрольным – $43,59 \pm 2,87$ мкМ. По всей видимости, это является результатом терапевтических мероприятий, оказавшихся успешными именно у этой группы больных. Изменения в количестве МДА не зависели от типа течения болезни до начала лечения и достоверно различались в зависимости от типа во второй и третьей точке обследования больных.

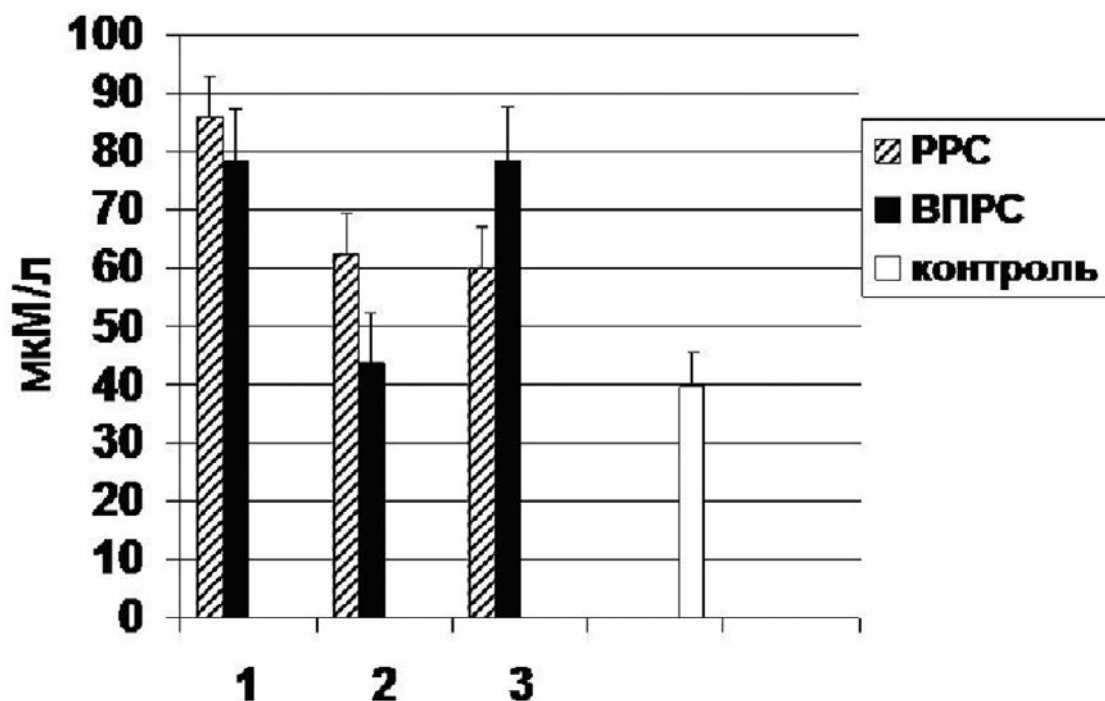


Рисунок 1.

Количество малонового диальдегида в эритроцитах больных РРС и ВПРС до терапии (1), после 3-х месячного курса терапии (2), 6 месяцев лечения (3) и здоровых лиц.

Здесь и в рисунках 2-6 единица ферментативной активности U со-ответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C.

Изменения в активности глутатионпероксидазы (ГП) носили аналогичный характер (рис. 2): у всех обследованных больных активность ГП была повышена в 2-3 раза, за исключением активности фермента во 2-ой точке обследования у больных с ВПРС, где она хоть и имела тенденцию к повышению в сравнении с контролем – эти изменения были недостоверны. По всей видимости, мы имеем дело с субстратной активацией ГП, в связи с увеличением общего количества липо- и гидропероксидов, вызванных активацией окислительных процессов в клетке. Следует отметить, что активность ГП не зависела от типа течения РС.

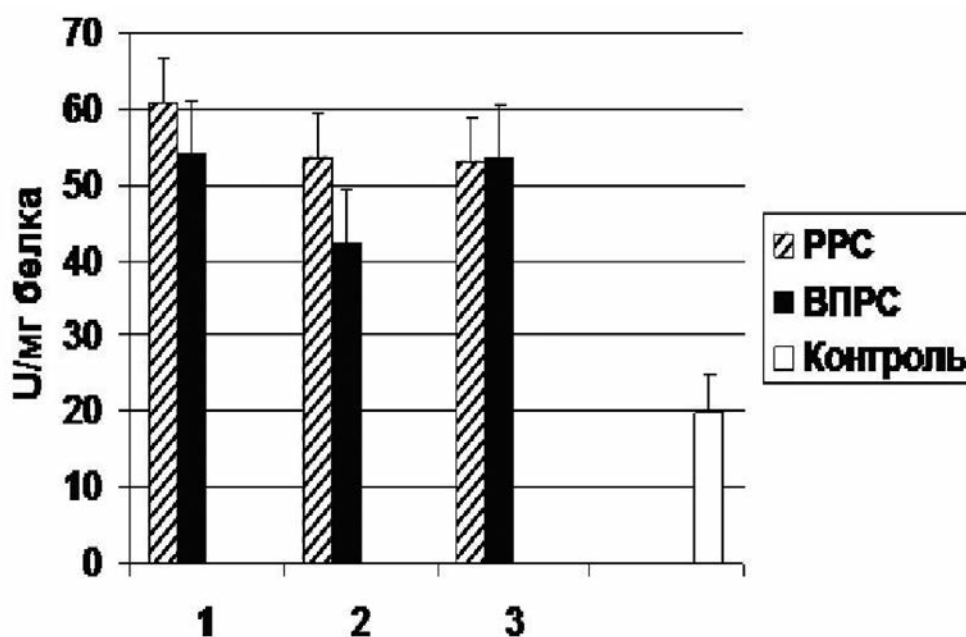


Рисунок 2.

Активность глутатинпероксидазы в эритроцитах больных РРС и ВПРС до терапии (1), после 3-х месячного курса терапии (2), 6 месяцев лечения (3) и здоровых лиц.

Активность глутатионредуктазы (ГР) у больных (рис. 3) в течение всего периода наблюдения достоверно отличалась от контрольной группы. Во всех исследованных точках, кроме одной, активность ГР снижалась до 4 раз в сравнении с контрольной группой. У больных ВПРС этот показатель оказался выше контроля вдвое через 3 месяца от начала лечения. По всей видимости, этот факт напрямую связан с уменьшением количества МДА и, как следствие, снижением активности ГП у этих больных.

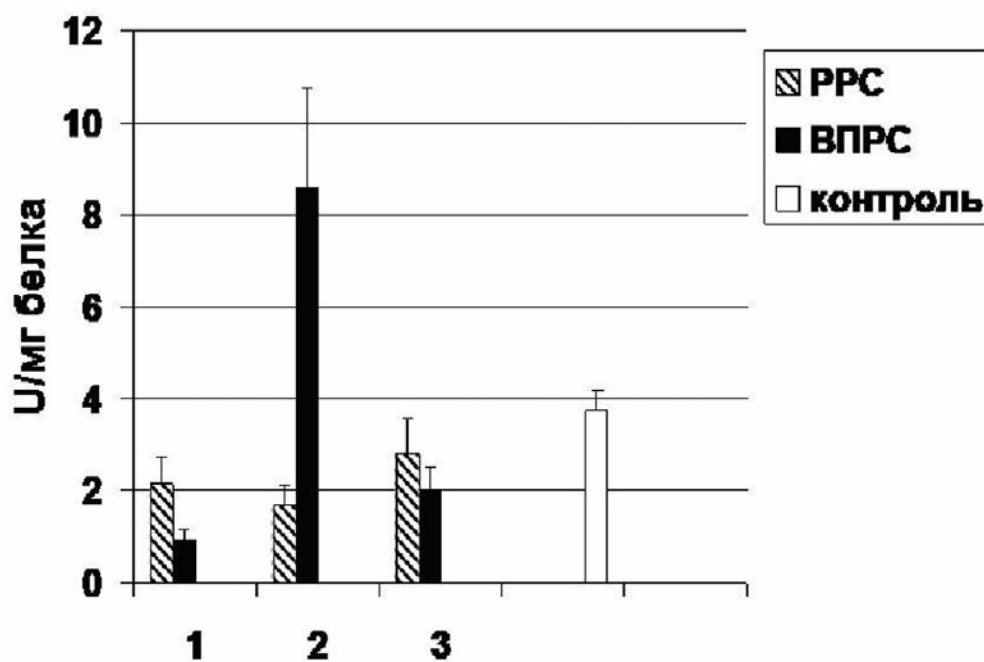


Рисунок 3.

Активность глутатионредуктазы в эритроцитах больных РРС и ВПРС до терапии (1), после 3-х месячного курса терапии (2), 6 месяцев лечения (3) и здоровых лиц.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ПРИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Активность глутатионтрансферазы (ГТ) (рис. 4) была достоверно снижена у всех больных по сравнению с активностью этого фермента у лиц контрольной группы. В зависимости от типа течения активность ГТ имела достоверное отличие в первой точке: у больных с РРС она была достоверно снижена в 2 раза при сравнении с группой ВПРС. Во второй точке активность ГТ у больных с ВПРС достоверно снизилась до величин, регистрируемых у пациентов с РРС. Положительная динамика в изменении активности АОС и снижение количества МДА можно расценивать, как однозначный положительный эффект проводимой терапии у этой группы больных.

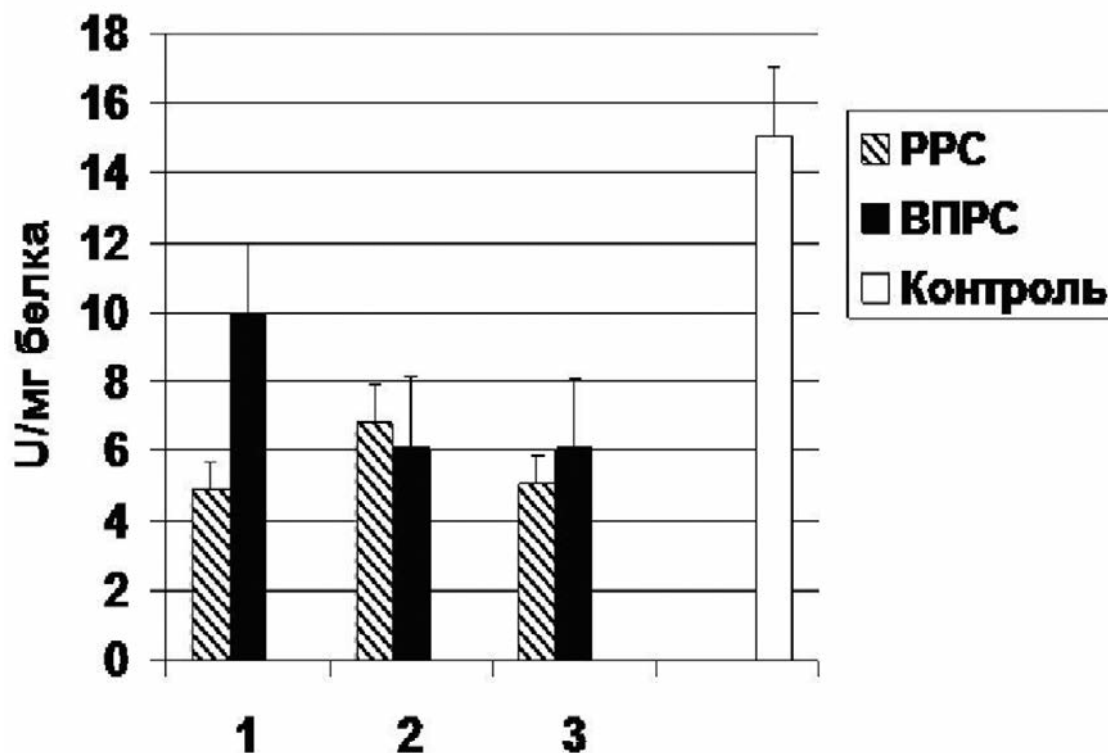


Рисунок 4.

Активность глутатионтрансферазы в эритроцитах больных РРС и ВПРС до терапии (1), после 3-х месячного курса терапии (2), 6 месяцев лечения (3) и здоровых лиц.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) (рис. 5) оставалась достоверно высокой у больных с РРС, в сравнении с больными ВПРС ($3,46 \pm 0,29$ - $3,6 \pm 0,33$ Ед/мг белка), превышая это значение в 1,8-2,5 раза на протяжении всего наблюдения. Активность Г-6-ФДГ у здоровых лиц $9,21 \pm 1,67$ Ед/мг белка более, чем в 2,5 раза достоверно превышала значения активности у больных с ВПРС. Активность Г-6-ФДГ у больных с РРС достоверно не отличалась от активности этого фермента у здоровых лиц, хотя и имела тенденцию к снижению.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) (рис. 6) у здоровых лиц была достоверно выше всех значений активности больных на протяжении всего исследования. Также достоверна была разница между активностью СОД с разными типами течения до, во время и после терапевтического лечения, что говорит о различном метаболизме супероксид аниона у больных в этих группах. Увеличение количества МДА, согласующееся со снижением активности СОД, у больных с ВПРС объясняет активацию процессов ПОЛ в последней точке наших наблюдений.

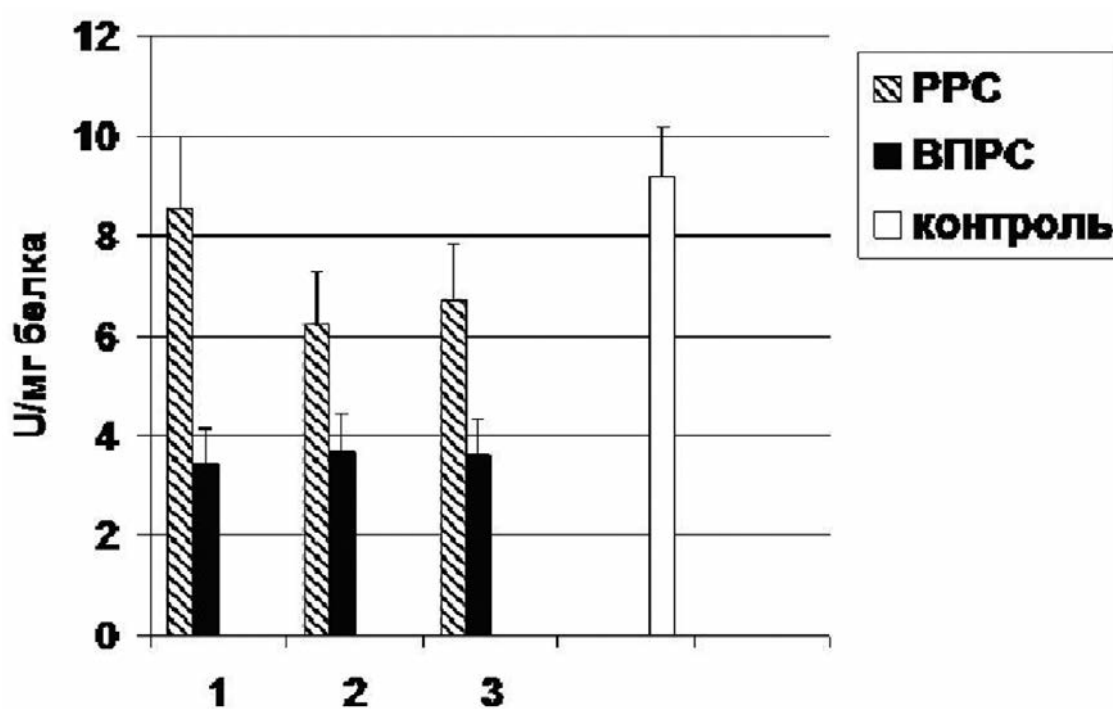


Рисунок 5.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах больных РРС и ВПРС до терапии (1), после 3-х месячного курса терапии (2), 6 месяцев лечения (3) и здоровых лиц.

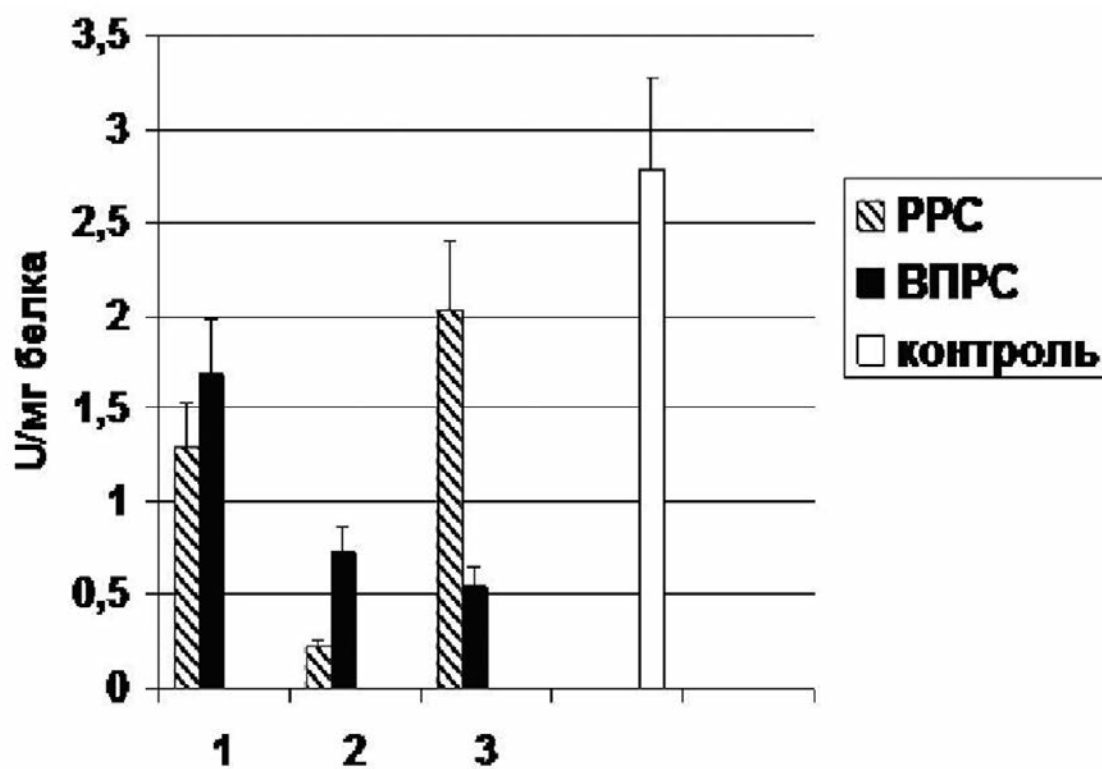


Рисунок 6.

Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах больных РРС и ВПРС до терапии (1), после 3-х месячного курса терапии (2), 6 месяцев лечения (3) и здоровых лиц.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ПРИ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Определение общей антиоксидантной активности сыворотки крови заключалось в способности сыворотки крови снижать хемилюминесценцию в модельной системе: гемоглобин – перекись водорода – люминол. Интенсивность хемилюминесценции обратно пропорциональна активности АОС. Графики хемилюминесценции (ХЛ), характеризующие интегральное состояние АОС сыворотки крови в процессе фармакотерапии больных РС, представлены на рисунке 7. В общей группе пациентов с демиелинизирующими заболеваниями нервной системы до начала лечения обнаружены достоверно значимые высокие показатели интенсивности индуцированной ХЛ, что свидетельствует о низких АОС сыворотки крови по сравнению с нормальными значениями здоровых лиц ($p < 0,01$). После проведения комплексной фармакотерапии АОС крови пациентов достоверно улучшились ($p < 0,05$) по сравнению с кривой до лечения, но были ниже показателей здоровых лиц ($p < 0,05$).

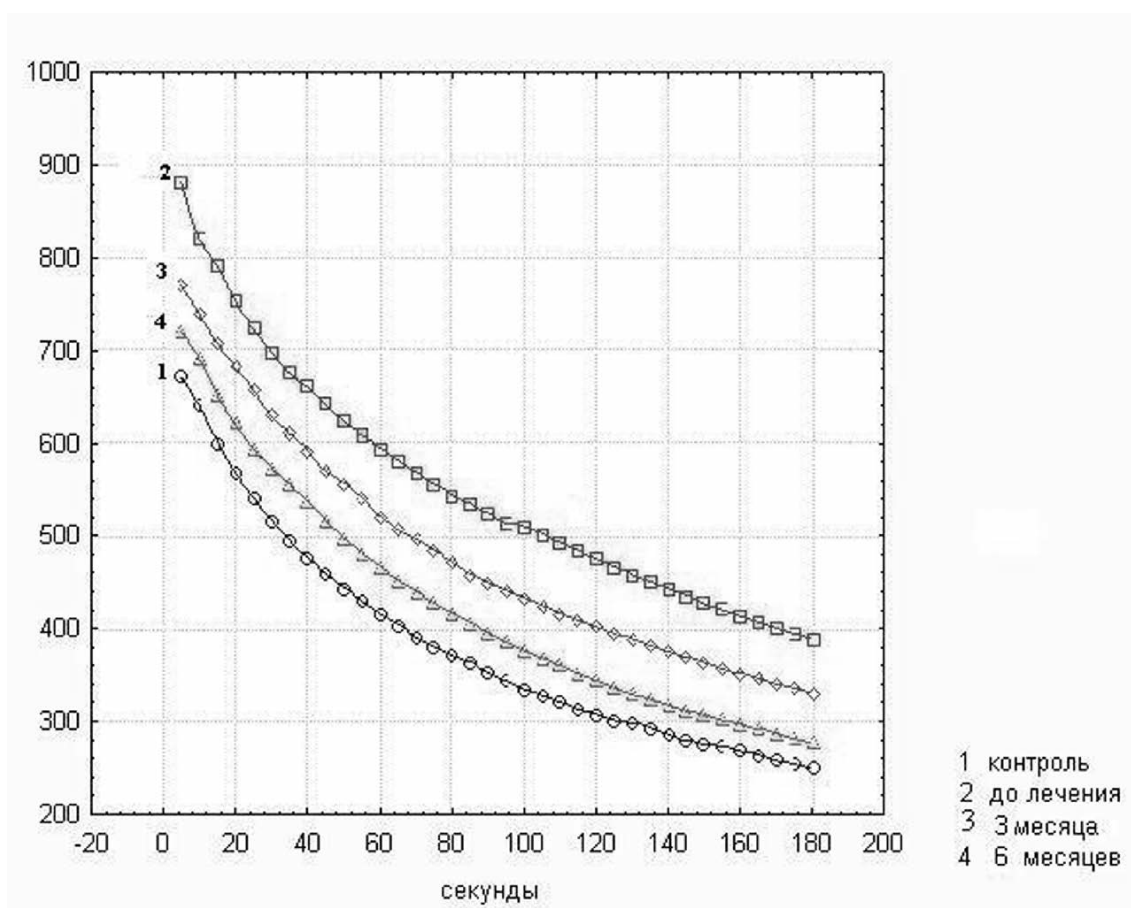


Рисунок 7.

Общая антиоксидантная активность сыворотки крови больных всеми ти-пами РС до терапии (2), после 3-х месячного курса терапии (3), 6 месяцев лечения (4) и здоровых лиц (1).

Антиоксидантная активность выражена в интенсивности тушения хемилюминесценции в модельной системе: гемоглобин - перекись водорода - люминол.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты исследования свидетельствуют об участии оксидантного стресса в патогенезе РС. Наличие разнонаправленных изменений в ответ на терапию у больных с разными типами болезни говорит о том, что РРС и ВПРС по-разному реагируют на терапевтическое воздействие. Это проявляется,

в частности, в различном влиянии лечения на активность АОС. Высокий уровень МДА и активности ГП практически на всём протяжении наблюдений позволяет делать вывод об активно идущих в организме больных процессах ПОЛ [18]. Снижение активности Г-6-ФДГ у больных с ВПРС, в сравнении с больными РРС и здоровыми людьми, говорит о наличии дефицита этого фермента только у больных с ВПРС. Не исключено, что этот дефект обуславливает более тяжёлое течение данного типа РС, т.к. Г6ФДГ является поставщиком важнейшего компонента для нормального функционирования окислительно-восстановительной системы клетки NADPH. Увеличение активности ГР, у больных ВПРС после 2 недель проведения терапии, и СОД у больных РРС после проведённой терапии можно расценивать как положительный эффект терапии. Увеличение активности СОД именно в конце лечения у больных РРС может являться положительным прогностическим признаком для данной формы болезни. Но низкая активность большинства АОФ свидетельствует о тяжести заболевания и вовлечённости в патологический процесс всех систем клеточного метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко А.Н., Фаворова О.О. (1995) Молекулярн. биол., **29**, 727-749.
2. Гусев Е.И., Бойко А.Н. (2001) Рассеянный склероз: от изучения иммунопатогенеза к новым методам лечения. ООО "Губернская медицина", М., с. 128
3. Дильман В.М., Голубев А.Г. (1981) МРЖ, разд. XXI, 36-44.
4. Луцкий М.А., Есауленко И.Э. (2006) Рассеянный склероз, №3, 26-29.
5. Завалишин И.А., Захарова М.Н., Аскарлова Л.Ш. и др. (1997) Журн. неврол. и психиатр., **97**(5), 64-67.
6. Smith K.J., Karoor R., Felts P.A. (2007) Brain Pathol., **3**, 69-92.
7. Меньщикова Е., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. (2008) Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск.
8. Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. (2004) J. Neurol., **251**(3), 261-268.
9. Kurtzke J.F. (1984) (С.М. Poser, ed.), NY: Thieme-Stratton, pp. 3-13.
10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) Современные методы в биохимии, М.: Медицина, с. 66-67.
11. Little C. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., **31**, 145-150.
12. Carbery J., Mannervick B. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 5475-5480.
13. Keen J.H. (1976) J. Biol. Chem., **251**, 6183-6188.
14. Суханова Г.А., Мамонтова И.П., Сальник Б.Ю. (1983) Энзимология, Томск, 76 с.
15. Смирнова Л.П., Кондакова И.В., Борунов Е.В. (2006) Патент на изобретение "Способ определения активности супероксиддисмутазы" N 2272074, опубл.: 20.03.2006 Бюл. N 8.
16. Bredford M. (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-354.
17. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., Сидоров Ю.С. (1975) Перекисное окисление липидов в биомембранах, М.: Медицина.
18. Beckman K.B., Ames B.N. (1998) Physiol. Rev., **78**, 547-581.

Поступила: 01. 09. 2009.

ANTIOXIDANT SYSTEM STATE IN PATIENTS
WITH MULTIPLE SCLEROSIS CURRENT IN THERAPY

L.P. Smirnova¹, N.V. Krotenko², E.V. Grishko¹, N.M. Krotenko², V.M. Alifirova¹, S.A. Ivanova²

¹Institution of Russian Academy of Medical Sciences, Mental Health Research Institute, ul. Aleutskaya, 4,
v. Sosnovy Bor, Tomsk, 634014 Russia; tel.: +7(382-2)72-43-79; fax: + 7 (382-2) 72-44-25;
e-mail: lpsmirnova@yandex.ru

²Siberian State Medical University of Federal Agency on Healthcare and Social Development, Tomsk

Activity of erythrocyte glutathionperoxidase (GP), glutathionreductase (GR), glutathiontransferase (GT), glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH), catalase and superoxiddismutase (SOD), and also, the level of malonic dialdehyde (MDA) and total antioxidant activity of blood serum were studied in patients with different types of multiple sclerosis. Investigation of peripheral blood was carried out on first day of treatment and after standard therapy of copaxone. All MS patients had high level of MDA and activity of GP in erythrocytes in comparison with a control group. Other antioxidant enzymes of erythrocytes and total antioxidant activity of blood serum exhibited weak positive dynamics in patients with a relapsing remittance of multiple sclerosis (RRMS). Decrease of activity of antioxidant system in patients with secondary progression multiple sclerosis (SPMS) was more pronounced and remained unchanged after the treatment. This is consistent with the more severe clinical course of this disease.

Key words: oxidative stress, antioxidant enzymes, multiple sclerosis.