

*Азалия Айсаровна СОКОЛОВА —
зав. кафедрой нервных болезней
Ханты-Мансийского государственного
медицинского института
кандидат медицинских наук, доцент*

УДК 616.832-004.2

СОСТОЯНИЕ МЕМБРАННО-ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ПРОЦЕССОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

АННОТАЦИЯ. Статья посвящена важнейшей проблеме современной неврологии — углублению представлений о патогенезе рассеянного склероза.

The article is dedicated to the main problem of contemporary neurology this is to deepen statements of multiple sclerosis pathogenesis.

Введение

Актуальность проблемы рассеянного склероза (РС) несомненна из-за роста распространенности заболевания и тяжелых социально-экономических последствий [4,5,7,9]. Наибольший интерес представляет изучение патогенеза рассеянного склероза, как ключа к поиску перспективных методов патогенетической терапии при данном заболевании. РС заболевают в основном люди молодого и зрелого возраста от 20 до 40 лет. В последние десятилетия отмечен рост заболеваемости рассеянным склерозом, более высокие показатели регистрируются в северных, северо-западных и западных районах [1,5,7,9]. Среди основных причин повышения эпидемиологических показателей выделяют улучшение качества диагностики, принятие унифицированных диагностических шкал, а также реальное увеличение заболеваемости.

Изучение характера мембранно-дестабилизирующих процессов в нервной системе затруднено по причине недоступности нервной клетки для биохимического исследования. Однако, учитывая наследственный характер изменений липидного обмена при РС [3, 8], можно предполагать однородность повреждения мембранных структур различных клеточных групп при этом заболевании [2]. Кроме того, известно, что расположение липидов в мембранах нейронов, астроцитов, олигодендроцитов, гепатоцитов и эритроцитов однотипно. Установлено также, что изменение липидного состава в тех и других клетках ведет к одинаковым нарушениям свойств их мембран [3, 8].

Выбор эритроцита в качестве модели представляется нам тем более логичным, что из-за насыщенности мембран этих клеток легкоокисляемыми фосфолипидами и одновременном контакте с большими концентрациями кислорода, именно в эритроцитах находят отражение наиболее общие метаболические процессы, проходящие в других клетках организма.

Цель исследования

Изучить у больных рассеянным склерозом на модели эритроцита роль мембранно-дестабилизирующих процессов в патогенезе заболевания и связь мембранно-дестабилизирующих процессов в эритроцитарных мембранах с состоянием антиоксидантной системы защиты.

Исходя из цели исследования, нами поставлены следующие задачи:

- изучить у больных рассеянным склерозом: фосфолипидный состав эритроцитарных мембран, содержание холестерина в них, активность фосфолипазы А₂;
- провести корреляционный анализ уровня антиоксидантной защиты и выраженности мембранно-дестабилизирующих процессов у больных рассеянным склерозом;
- оценить изменения состояния эритроцитарных мембран в зависимости от тяжести рассеянного склероза, варианта течения заболевания и прогноза.

Экспериментальная часть

Для решения поставленных задач нами использован комплекс современных биохимических методов:

- изучение содержания продуктов свободно-радикального окисления липидов в мембранах эритроцитов (диеновых конъюгатов полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов и шиффовых оснований);
- изучение уровня антиоксидантной защиты на основании определения содержания альфа-токоферола — жирорастворимого антиоксиданта и исследования активности супероксиддисмутазы, каталазы и глюкозо-6-фосфаидегидрогеназы;
- определением содержания фосфолипидов в мембранах эритроцитов методом тонкослойной хроматографии на силикагеле и определение холестерина;
- определением фосфолипазной активности эритроцитов.

Мы обследовали 61 больного с диагнозом «рассеянный склероз»: 45 женщин и 16 мужчин. Средний возраст обследованных $40,49 \pm 0,87$ лет. Контрольную группу составили 30 практически здоровых доноров: 15 мужчин и 15 женщин аналогичного возраста ($40,57 \pm 0,79$ лет).

В работе использованы диагностические критерии Шумахера, шкала Позера и шкала функциональных систем Курцке.

Всем больным проводились исследования неврологического статуса, ядерно-магнитный резонанс головного и спинного мозга, исследование глазного дна, а также общеклинические анализы крови и мочи, электрокардиография. Все больные были проконсультированы терапевтом, нейроофтальмологом, при необходимости — психиатром.

Полученные цифровые данные подвергнуты математической обработке на персональном компьютере «Pentium-200» с помощью пакета статистической обработки данных «Armstat». Статистическая обработка производилась с использованием *t*-критерия Стьюдента для парных и непарных величин. Достоверность различий средних показателей оценивали при 95% доверительном интервале. Корреляционный анализ проводили путем вычисления коэффициента корреляции. Значимость корреляции оценивали с помощью критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при значении $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Автором выявлено, что у больных рассеянным склерозом, независимо от течения заболевания (ремиттирующее, первично-прогрессирующее или вторично-прогрессирующее) повышено содержание в эритроцитарных мембранах липоперекисей — диеновых конъюгатов и шиффовых оснований. Параллельно повышению активности процессов перекисления мембранных липидов у больных рассеянным склерозом повышается активность фосфолипазы А₂. Все это представляет собой основу для первичной и вторичной дестабилизации структурно-

функциональной организации клеточных мембран со всеми вытекающими отсюда патоморфологическими и патохимическими изменениями в интра- и экстрацеллюлярных пространствах.

Дифференцированный анализ активности процессов перекисления липидов и эндогенных фосфолипаз в зависимости от тяжести заболевания позволил выявить прямую взаимосвязь между клиническими и биохимическими параметрами. Так, выраженность исследуемых процессов последовательно возрастала от уровня у больных наиболее благоприятной ремиттирующей формой рассеянного склероза, достигая максимальных значений при вторично-прогрессирующем и первично-прогрессирующем течении.

Принципиальным отличием ремиттирующего течения рассеянного склероза от других вариантов течения (вторично-прогрессирующее и первично-прогрессирующее) является его более благоприятная неврологическая симптоматика и лучший прогноз. Выраженность морфологического дефекта в центральной нервной системе при ремиттирующем варианте течения рассеянного склероза менее значительна, чем при вторично-прогрессирующем и первично-прогрессирующем течении. Исходя из этого, мы можем заключить, что мембрано-дестабилизирующие механизмы (фосфолипазное и перекисное окисление мембранных липидов), значимые в патогенезе любого варианта рассеянного склероза, в значительной степени влияют на тяжесть заболевания и степень повреждения структур центральной нервной системы.

Об этом же свидетельствуют количественные характеристики активности эндогенных фосфолипаз и процессов перекисления мембранных липидов в зависимости от стадии заболевания: уровень активности фосфолипазы А₂ и содержание продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов патогенетически значимы в возникновении обострения рассеянного склероза (разница между анализируемыми показателями при обострении и ремиссии заболевания статистически достоверна).

Наряду с этим обращает внимание чрезвычайная стабильность выявленных изменений (активность фосфолипазы А₂ и содержание диеновых конъюгатов более чем в 2 раза превосходят нормативные показатели и в период клинической ремиссии заболевания). Это может косвенно свидетельствовать о том, что стабилизация патофизиологических процессов в центральной нервной системе отстает от стабилизации клинических проявлений патологии.

Активному воздействию на мембраны процессов перекисления и эндогенных фосфолипаз подвергаются прежде всего мембранные липиды, в результате чего, согласно литературным данным, происходит модификация липидного бислоя клеточных мембран [3, 6].

Мы провели исследование содержания основных фракций фосфолипидов и холестерина в мембранах эритроцитов у больных рассеянным склерозом. При анализе результатов обращает внимание уменьшение содержания сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина в мембранах эритроцитов при всех вариантах течения рассеянного склероза. Содержание холестерина в мембранах эритроцитов также снижено, но в различной степени, в зависимости от характера течения заболевания, а именно: при ремиттирующей форме отмечается тенденция к снижению содержания холестерина (статистически не достоверно), в то время как при более тяжелом течении заболевания выявлено его статистически достоверное снижение.

Кроме того, выявленное в наших наблюдениях обеднение мембран эритроцитов, как фосфолипидами, так и холестерином протекает на фоне накопления мембранодетергентной фракции — лизофосфатидилхолина.

В целом можно констатировать, что нами выявлены как количественные, так и качественные изменения структуры липидной фазы эритроцитарных мембран, выраженность которых сопряжена с тяжестью течения рассеянного склероза.

Анализ структуры липидной фазы эритроцитарных мембран у больных рассеянным склерозом в зависимости от стадии заболевания (обострение или ремиссия) позволяет констатировать, что в период обострения рассеянного склероза в мембранах эритроцитов наблюдается значительное снижение всех фракций фосфолипидов (в наибольшей степени уменьшено содержание высоконенасыщенного фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина) на фоне повышения мембранодетергентной фракции — лизофосфатидилхолина. Повышенный гидролиз фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина можно объяснить как высокой степенью их ненасыщенности, так и следствием активации фосфолипазы А₂.

Накопление лизофосфатидилхолина имеет особое патогенетическое значение, так как лизофосфолипиды обладают прямым цитотоксическим действием на олигодендроцит [8]. Мы выявили также снижение уровня общего холестерина в мембранах эритроцитов.

В период ремиссии строение липидного бислоя мембран эритроцитов больных рассеянным склерозом также не соответствует нормативным параметрам.

Полученные данные наглядно отражают последствия избыточной активности эндогенных фосфолипаз и процессов перекисления мембранных липидов. Сопряженность процессов ПОЛ и структуры липидной фазы эритроцитарных мембран подтверждается проведенным нами корреляционным математическим анализом.

Выявлены высокодостоверные отрицательные корреляционные взаимосвязи между активностью ФЛА₂ и содержанием СфМ ($r = -0,67$; $p < 0,05$), диеновых конъюгатов и ФЭА ($r = -0,73$; $p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что закономерное уменьшение концентрации сфингомиелинов и фосфатидилэтаноламинов по мере повышения активности ФЛА₂ и процессов ПОЛ обусловлено первоочередным вовлечением данных фосфолипидов в процессы фосфолипазного и перекисного окисления липидов. Вторичное воздействие на мембраны лизоформ фосфолипидов способствует образованию дополнительных ионных каналов, нарушению трансмембранного транспорта, повышению проницаемости, ингибированию каталитических центров мембранных ферментов.

Состояние антиоксидантной системы защиты в организме является одним из важнейших механизмов, регулирующих активность перекисления липидов, и косвенно — функциональную значимость эндогенных фосфолипаз. Дефицит или несостоятельность различных звеньев антиоксидантной защиты создают перспективу для формирования цепных реакций дестабилизации клеточных мембран.

Анализ состояния отдельных звеньев системы антиоксидантной защиты у больных рассеянным склерозом позволил выявить ряд изменений. Так, при ремитирующем течении рассеянного склероза мы не выявили значимых отличий от контроля как активности ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ)), так и содержания альфа-токоферола в мембранах эритроцитов больных рассеянным склерозом, что свидетельствует о состоятельности исследованных нами звеньев системы антиоксидантной защиты.

У больных с менее благоприятным течением РС (вторично-прогредиентное и первично-прогредиентное течение) мы выявили значительное снижение активности ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, Г-6-ФДГ) и дефицит альфа-токоферола в мембранах эритроцитов. При этом депрессия системы анти-

оксидантной защиты более выражена у больных с наиболее неблагоприятным течением рассеянного склероза (первично-прогрессирующим).

Полученные результаты могут свидетельствовать, что при неблагоприятном течении РС (вторично-прогрессирующее, первично-прогрессирующее) у больных наблюдается срыв компенсаторных возможностей исследованных звеньев системы антиоксидантной защиты. Несостоятельность системы антиоксидантной защиты является дополнительным фактором, ведущим к активации процессов ПОЛ, и в конечном итоге — изменению функциональных свойств клеточных мембран.

Как следует из представленных результатов, совершенно очевидно, что в период exacerbации РС наблюдается статистически достоверное снижение активности ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы, Г-6-ФДГ) в сочетании с уменьшением содержания в мембранах эритроцитов эндогенного антиоксиданта — альфа-токоферола.

В период ремиссии активность ферментов антиоксидантной защиты повышается, но остается меньше, чем в контрольной группе. Содержание альфа-токоферола в мембранах эритроцитов в период ремиссии также повышается, но не достигает нормативных параметров, что свидетельствует об истощении пула эндогенного антиоксиданта в условиях его повышенной элиминации при свободно-радикальном стрессе.

Выявленные изменения являются свидетельством того, что система антиоксидантной защиты испытывает напряжение в период обострения при рассеянном склерозе. Вполне вероятно, что несостоятельность отдельных звеньев системы антиоксидантной защиты является одним из факторов, ведущих к exacerbации рассеянного склероза.

Проведенный корреляционный математический анализ выявил высокодостоверные отрицательные корреляционные взаимосвязи между активностью фосфолипазы А2 и уровнем активности СОД ($r=-0,584$; $p<0,05$), содержанием диеновых конъюгатов и уровнем активности СОД ($r=-0,724$; $p<0,05$), содержанием диеновых конъюгатов и альфа-токоферола в мембранах эритроцитов ($r=-0,671$; $p<0,05$).

Мы выявили также высокодостоверные отрицательные корреляционные взаимосвязи между тяжестью клинических проявлений рассеянного склероза и активностью СОД ($r=-0,651$; $p<0,05$).

На завершающем этапе исследований с помощью корреляционного математического анализа нами выявлена связь активации процессов фосфолипазного и перекисного окисления липидов с депрессией антиоксидантных механизмов защиты и зависимость структуры клеточных мембран эритроцитов от равновесия между этими системами.

Кроме того, проведенный нами корреляционный математический анализ позволил установить положительные корреляционные математические связи тяжести клинических проявлений рассеянного склероза и содержания в мембранах эритроцитов больных продуктов ПОЛ и мембранодетергентной фракции фосфолипидов — лизофосфатидилхолина и отрицательные корреляционные математические связи тяжести клинических проявлений рассеянного склероза и активности ферментов антиоксидантной защиты, а также содержанием в мембранах эритроцитов эндогенного антиоксиданта альфа-токоферола.

В целом в мембранах эритроцитов больных РС выявлены существенные изменения, которые сводятся к активации ПОЛ, согласующиеся с ростом активности фосфолипазы А2, изменением активности антиоксидантных ферментов и содержания альфа-токоферола, к связанным с этим количественным и качественным нарушениям липидного состава клеточных мембран. Все это в сово-

купности выливается в стандартную реакцию организменного уровня — окислительный стресс, сопровождается изменением активности ферментов трансмембранного переноса ионов, специфических протеолитических ферментов и вполне вероятно может быть одной из ведущих причин повреждения миелина при рассеянном склерозе.

Таким образом, мы можем констатировать, что в патогенезе рассеянного склероза значительное место принадлежит активации ферментативного и свободно-радикального окисления липидов клеточных мембран в условиях несостоятельности или неполной состоятельности механизмов антиоксидантной защиты. Следствием этого являются значительные изменения структуры клеточных мембран и их функции. Выявленные на модели эритроцитов изменения являются базовыми, коррелируют с тяжестью клинических проявлений рассеянного склероза, а значит, во многом их определяют.

Выводы

1. Развитие рассеянного склероза сопровождается у больных значительным повышением в организме активности эндогенных фосфолипаз и процессов перекисления мембранных липидов, о чем свидетельствует накопление в мембранах эритроцитов липоперекисей — диеновых конъюгатов и шиффовых оснований.

2. При рассеянном склерозе в мембранах эритроцитов больных выявляются признаки напряжения системы антиоксидантной защиты — понижение активности супероксиддисмутазы, каталазы и снижение содержания альфа-токоферола.

3. У больных рассеянным склерозом происходят структурные изменения липидной фазы мембран эритроцитов в виде уменьшения содержания основных фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидолсерина, фосфатидилэтаноламина) и холестерина на фоне повышения содержания мембранодетергентной фракции — лизофосфатидилхолина.

4. Активность механизмов дестабилизации клеточных мембран при рассеянном склерозе детерминирована тяжестью клинических проявлений заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е. Б., Сторожок Н. М., Храпова Н. Г., Наумов В. В., Кухтина Е. Н. Изучение аддитивного антиокислительного действия суммы природных антиоксидантов липидов // *Вопр. мед. химии*. 1990. № 4. С. 12-74.

2. Бышевский А. Ш., Терсенов О. А. Биохимия для врачей. Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. 383 с.

3. Гусев Е. И., Бойко А. Н. Некоторые клинические и медико-социальные аспекты новых методов патогенетического лечения рассеянного склероза // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2001. № 12. С. 7-11.

4. Гусев Е. И., Беляева И. А., Чехонин В. П., Демина Т. Л., Бойко А. Н., Бутлак А. В., Гурина О. И. Сравнительный клинико-иммунологический анализ ремиттирующего и вторично-прогрессирующего течения рассеянного склероза // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2000. № 6. С. 51-57.

5. Завалишин И. А., Головкин В. И. Этиология и патогенез рассеянного склероза // *Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики*. М., 2000. С. 4-25.

6. Захарова М. Н. Липиды миелина // *Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики* / Под ред. Завалишина И. А., Головкина В. И. М., 2000. С. 60-69.

7. Иерусалимский А. П., Малкова Н. А. Эпидемиологические исследования и их роль в изучении рассеянного склероза // *Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики* / Под ред. Завалишина И. А., Головкина В. И. М., 2000. С. 510-536.

8. Переседова А. В. Свободно-радикальные реакции и аутоантитела к фактору роста нервов при рассеянном склерозе: Автореф. ... канд. мед. наук. М., 1999. 40 с.

9. Столяров И. Д., Осетрова Б. А. Рассеянный склероз. СПб., 2002. 174 с.