

На правах рукописи

Воробьева Анна Александровна

**МАРКЕРЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ
ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ
(КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.01.11 – Нервные болезни

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр неврологии» Российской академии медицинских наук и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Захарова Мария Николаевна

доктор биологических наук, профессор **Гуляева Наталья Валерьевна**

Официальные оппоненты:

Бойко Алексей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист-невролог Департамента здравоохранения г.Москвы

Узбеков Марат Галиевич, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории патологии мозга Федерального государственного бюджетного учреждения " Московский научно-исследовательский институт психиатрии " Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Защита состоится: «14» октября 2014г. в 11:00 на заседании диссертационного совета Д 001.006.01 при ФГБУ «НЦН» РАМН по адресу: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НЦН» РАМН. 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

Автореферат разослан « ___ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 001.006.01
кандидат медицинских наук

Елена Владимировна Гнедовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Рассеянный склероз (РС) является мультифакториальным, аутоиммунным хроническим демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы (ЦНС). РС - вторая по распространенности причина инвалидности среди молодого населения и является не только социально, но и экономически значимым заболеванием.

До недавнего времени считалось, что нарушение проводящей функции аксонов при РС происходит только вследствие многоочагового поражения миелиновой оболочки (Popescu et al, 2012). Однако более поздние исследования показали, что нейродегенерация (то есть невоспалительное повреждение серого и белого вещества головного мозга) имеет место уже на ранних стадиях РС, играет большое значение в формировании необратимого неврологического дефицита, а локализация ее не ограничена бляшками демиелинизации (Bjartmar et al, 2001; Geurts et al, 2008; Lucchinetti et al., 2011). Данные о патогенезе первичной нейродегенерации при РС крайне немногочисленны, остаются неясными основные причины и механизмы ее развития. Данные исследований, доступных в клинической практике, не позволяют оценить вклад нейродегенеративных изменений в неврологический дефицит конкретного больного, прогнозировать течение заболевания и эффективность терапии.

Биомаркерами называют поддающиеся количественному определению параметры, которые служат для оценки физиологических и патологических процессов в организме, таких как риск возникновения заболевания, воздействие факторов внешней, развитие заболевания и др. Биомаркерами нейродегенерации могут быть продукты деструкции аксонов, продукты изменения метаболизма и специфические протеины цитоплазмы нейронов. По определению маркеров нейродегенерации, являющихся именно структурными элементами, а именно, пептидов нейрофиламентов, при различных патологиях нервной системы накоплено большое количество данных (Hole et al, 1988; Friese et al, 2014). Изменение метаболизма при дегенеративных процессах

отражают продукты расщепления белка предшественника бета-амилоида: бета-амилоид 1-40 и бета-амилоид 1-42 (Augutis et al., 2013).

Большинство проведенных на настоящий момент исследований подтверждают изменение концентраций фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов (ФНФТ), легких цепей нейрофиламентов (НФЛ) и бета-амилоидов в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) при РС: уровень нейрофиламентов повышается в сравнении с контролем, уровень же бета-амилоидов либо остается неизменным, либо снижается (Fialova et al., 2013; Kuhle et al., 2010; Malet al, 2011; Szalardy et al., 2013). Динамика изменения концентраций маркеров, степень изменений при различных патологиях (демиелинизирующих, нейродегенеративных) остаются не достаточно исследованными. Более того, практически отсутствуют данные о соотношении концентраций маркеров, отличающихся по механизму образования.

В процессе нейродегенерации происходит разрушение клеток и иммуннокомпетентным клеткам могут быть презентированы новые антигены интрацеллюлярных или мембранных структур. При условии иммунной сенсбилизации новые аутоантигены могут потенцировать аутоиммунную реакцию и провоцировать дальнейшее развитие заболевания. Аутоантитела к продуктам деструкции клеток при РС были определены во многих проведенных исследованиях, однако роль их в патогенезе заболевания остается неясной, а методы детекции требуют существенной доработки (Fialova et al., 2013; Klaver et al., 2010; Quintana et al., 2012)

Таким образом, последние достижения биохимии позволяют с высокой точностью детектировать в биологических жидкостях исследуемые вещества и позволяют изучать биохимические аспекты физиологических и патологических процессов в организме человека. Поэтому исследование именно биохимических аспектов нейродегенеративного процесса при РС является актуальным и перспективным как для уточнения патогенеза заболевания, выявления новых мишеней терапии, так и для клинического представления о природе

неврологического дефицита конкретного больного, прогнозирования темпа прогрессирования болезни.

Цель исследования: Изучение маркеров нейродегенерации у больных с рассеянным склерозом, определение их иммуногенности и анализ диагностической значимости.

Задачи исследования:

1. Определить уровень маркеров аксонопатии тяжелых и легких цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови.
2. Исследовать наличие антител к тяжелым и легким цепям нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
3. Определить уровень бета-амилоида 1-40 и бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
4. Исследовать наличие антител к бета-амилоиду 1-40 и бета-амилоиду 1-42 в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
5. Оценить проницаемость гематоэнцефалического барьера по альбуминовому индексу (отношение концентрации альбумина в ликворе к концентрации его в плазме крови)
6. Изучить корреляции полученных биохимических данных и клинических характеристик пациентов
7. На основании полученных данных определить диагностическую значимость исследованных маркеров

Научная новизна

Впервые проведено комплексное клинико-биохимическое исследование наиболее изученных на настоящий момент маркеров нейродегенерации, принципиально отличающихся по патофизиологическому механизму образования. Выполнен твердофазный иммуноферментный анализ цереброспинальной жидкости и сыворотки крови на содержание тяжелых и легких цепей нейрофиламентов, бета-амилоидов 1-40 и 1-42 при ремиттирующем рассеянном склерозе, проведено сравнение концентрации

данных белков при ремитирующем рассеянном склерозе, в отсутствии неврологических заболеваний и при боковом амиотрофическом склерозе. Показана гетерогенность биохимических параметров нейродегенеративного процесса, в зависимости от стадии активности воспалительного процесса.

Практическая значимость

Установлено достоверное отличие фазы обострения и ремиссии РС по уровню амилоидов 1-40 и 1-42. Получено биохимическое подтверждение деструкции аксона во все фазы заболевания. Данные результаты позволяют более точно оценить выраженность нейродегенеративного процесса в каждом клиническом случае, понять причину необратимого неврологического дефицита, что может быть полезным в прогнозировании степени инвалидизации пациента.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Нейродегенерация уже на ранних стадиях РС может быть подтверждена при биохимическом анализе ЦСЖ изменением уровня структурных компонентов цитоскелета и продуктов расщепления трансмембранных белков
2. Нейродегенеративный процесс протекает неодинаково в различные фазы заболевания: в острой стадии воспаления в процессе нейродегенерации происходит не только деструкция аксона, но и метаболические изменения в их мембранах.
3. Деструкция аксона имеет место как в острую фазу нейровоспалительного процесса, так и в период его ремиссии
4. Уровень структурных компонентов цитоскелета нейрона в ЦСЖ отражает выраженность нейродегенерации при РС и позволяет провести сравнение по данному параметру с БАС
5. Соотношение маркеров непосредственной деструкции аксона и маркеров метаболических изменений характерных для РС может иметь диагностическое значение.

Апробация работы

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на расширенном заседании научных сотрудников 2, 3, 5, 6 неврологических отделений, отделения реанимации и интенсивной терапии, научно-консультативного отделения, отделения лучевой диагностики, лаборатории ультразвуковых исследований ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН и лаборатории функциональной биохимии нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук 23 июня 2014 года.

Материалы диссертации были представлены на: II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), 24th Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the American Society for Neurochemistry (ASN) (Cancun, Mexico, 2013), VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции (Новосибирск, 2013), XIX всероссийская конференция «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, 2013), XXI World Congress of Neurology (Vienna, 2013), European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (Copenhagen, 2013), I Национальной конференции с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике» (Москва, 2014), Joint Congress of European Neurology (Istanbul, 2014).

Полученные результаты внедрены в практику работы 6 неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 3 печатные работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора

Автором лично выполнено клиническое обследование и ведение пациентов в процессе стационарного лечения, осуществлен забор и обработка ликвора и крови, освоены и применены на практике методы детекции белков в биологических жидкостях, методики твердофазного иммуноферментного анализа. Выполнена аналитическая и статистическая обработка, обобщение полученных данных, сформулированы выводы и практические рекомендации, подготовлены публикации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц, 5 диаграмм и иллюстрирована 13 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, общей характеристики обследованных лиц и методов исследования, главы собственных результатов, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиографический указатель содержит 200 источников литературы, из которых 30 отечественных, 163 иностранных авторов и 7, публикации автора.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 56 больных с достоверным диагнозом РС, ремиттирующее течение, согласно обновленным критериям McDonald 2010 (Carvalhoetal, 2009). В группу сравнения было включено 26 пациентов с достоверным диагнозом БАС, установленным согласно Эль-Эскориальским критериям (Brookset al, 2000). В контрольную группу было включено 26 пациентов с хирургической патологии, которым проводилась спинальная анестезия, сравнимого возраста, без соматической и неврологической патологии.

В группу пациентов с обострением РС (ОРС) были включены пациенты с ремиттирующим РС, у которых в течение 48 часов наблюдалось появление новой очаговой неврологической симптоматики или усугубление ранее имевшейся и которые при этом в течение предыдущих 30 дней были стабильны (Rossi et al., 2011). В группу с ремиссией РС (РРС) были включены пациенты стабильные по неврологическому статусу более 30 дней. Неврологический дефицит пациентов с РС был оценен по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale), 10-бальной шкале тяжести состояния при РС (Kurtzke, 1983). Нарушение когнитивных функций, а именно самый распространенный его вариант при РС, снижение скорости обработки информации, оценивалось с помощью теста PASAT (paced auditory serial addition test, пошаговый аудиотест на серийное сложение чисел) (Gronwall, 1977; Raoetal, 1991).

Оценка функционального состояния пациентов с БАС была выполнена по шкале ALS FRS-R (Revised ALS functional rating scale).

Статистически значимо группы не отличались друг от друга по половому составу и продолжительности заболевания. Группы ОРС и РРС не отличались по оценке EDSS, продолжительности заболевания и числу обострений за весь период заболевания, однако значимым было их отличие по индексу прогрессирования заболевания (соотношение балла по шкале EDSS и продолжительности заболевания). В группе ОРС оказались случаи более быстрого прогрессирования заболевания в сравнении с группой РРС, однако

корреляций индекса прогрессирования с уровнем исследуемых маркеров в группах выявлено не было, поэтому сравнение данных групп по этим параметрам является допустимым. По возрасту группа БАС отличалась от групп ОРС и РРС, однако зависимости исследуемых параметров от возраста ни в одной из групп выявлено не было, в связи с чем сравнение этих групп можно также считать допустимым и оправданным.

30% Пациентов с РС (9 пациентов с ОРС и 7 пациентов с РРС) к моменту выполнения люмбальной пункции получали иммуномодулирующую терапию препаратами первой линии (глатирамера ацетат или интерферон - бета). Средняя продолжительность терапии составила 6 месяцев в случае глатирамера ацетата и 4 месяца в случае препаратов интерферона-бета. По клиническим характеристикам пациенты, получавшие препараты, изменяющие течение РС (ПИТРС), не отличались от остальных.

Пациенты, получавшие терапию цитостатическими препаратами или ПИТРС второй линии (финголимод, натализумаб) в исследование не включались. Также критериями исключения из исследования были сопутствующая соматическая патология в стадии декомпенсации, онкологические и другие аутоиммунные заболевания в анамнезе, значимые отклонения от референсных значений в результатах клинических анализов крови, мочи, биохимического анализа крови.

Из 26 пациентов с БАС на момент выполнения исследования на стадии генерализации (появление клинических или электронейромиографических (ЭНМГ) признаков поражения мотонейронов на трех уровнях: бульбарном, шейном, поясничном) заболевание было у 18 пациентов. Из них у 12 был быстрый темп развития заболевания (генерализация заболевания по клиническим данным или данным ЭНМГ в течение первого года заболевания). Продолжительность заболевания пациентов с БАС составила 14,5 [10; 24].

Основные характеристики исследуемых групп представлена в таблице 1.

Таблица 1. Основные характеристики исследуемых групп.

	Число пациентов, мужчины/женщины	Возраст, лет М [Q1, Q2]	Неврологический дефицит (EDSS/ALS-FRS-R)
ОРС	26 (11/15)	35,5 [27; 39]	3 [2; 4]
РРС	30 (13/17)	35,5 [30; 42]	3 [2; 3,5]
БАС	26 (12/14)	52 [42;58]	44,5 [43; 45]
контроль	26(10/16)	45,5 [31;51]	-

Забор и подготовка биологического материала

Образцы сыворотки крови и ликвора были получены во время стационарного лечения у пациентов ФГБУ «НЦН» РАМН. Забор крови осуществлялся из локтевой вены в утренние часы, натощак в пробирки с активатором свертывания (Vacutainer, BD). Сыворотку отделяли от клеток крови путем центрифугирования в течение 20 минут при 1500 g при комнатной температуре. Полученную надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки, образцы хранились при температуре – 70oC до момента выполнения исследования.

Люмбальная пункция была выполнена больным с РС и БАС после получения информированного согласия. Пробы ЦСЖ были собраны в стерильные пробирки, центрифугированы в течение 10 минут при 1500 g при комнатной температуре, затем алиquotированы и заморожены при температуре –70°C. Во всех группах, забор крови осуществлялся до начала терапии метилпреднизолоном по поводу настоящего обострения. Контрольные образцы ликвора были получены при выполнении спинальной анестезии больным с хирургической патологией.

Биохимические методы исследования

Для определения уровня биомаркеров в сыворотке и ЦСЖ в работе использовали следующие коммерческие наборы для выполнения сэндвич-ИФА:

- ФНФТ- EnCor Biotechnology, США; Neuromics, США
- НФЛ – UmanDiagnostics, Швеция
- бета-амилоид 1-42 – Invitrogen, США

- бета-амилоид 1-40 - MerckMillipore, США

Исследование было проведено строго согласно протоколам производителей.

Все измерения образцов проводили в двух параллельных пробах, калибровочную кривую строили по измерениям в трех параллельных пробах.

Антитела к нейрофиламентам и бета-амилоидам определялись непрямым неконкурентным ИФА ЦСЖ и сыворотки крови по разработанному нами протоколу на основании результатов проведенных к настоящему моменту исследований (Bartos et al., 2007) на высокосорбентной пластиковой плашке. Все измерения образцов проводились в двух параллельных пробах, для каждой пробы также были выполнены два отрицательных контроля (ячейки без исследуемого антигена, в остальном полностью идентичные пробам).

Уровень альбумина в ЦСЖ и сыворотке крови пациентов определялся на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30I praim методом колориметрии после добавления бромкрезола зеленого.

Статистическая обработка результатов

Количественные переменные описывали следующими параметрами: медианой (M), 25-ым и 75-ым процентилями (M [Q1;Q2]). Для сравнения двух групп по количественному признаку применяли критерий Манна-Уитни, с поправкой Бонферрони в случаях множественных сравнений. Для сравнения трех и более групп по количественному признаку применяли критерий Крускала-Уоллиса. Для выявления корреляции данных был использован тест ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости для всех тестов принимался за $p=0,05$.

Ввиду выполнения анализа в несколько этапов для более точного сравнения данных результаты были представлены в % от контроля – процентном соотношении концентраций в образцах больных и средней концентрацией маркера в контрольных образцах, детектированных на той же плашке. Такое относительное выражение уровня детектируемого методом ИФА вещества позволяет с большей точностью сравнивать результаты

экспериментов, проведенных не одновременно [7, 36, 37]. Расчет выполнен на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel 2003 и пакета статистического анализа данных Statistica 8.0 for Windows (StatSoft Inc., США). Для проведения ROC-анализа использовался он-лайн калькулятор «SimpleROCCurveAnalysis».

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦН» РАМН (протокол №5/12 от 11.03.2012 г.), все пациенты перед выполнением исследовательских процедур прошли процедуру подписания информированного согласия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

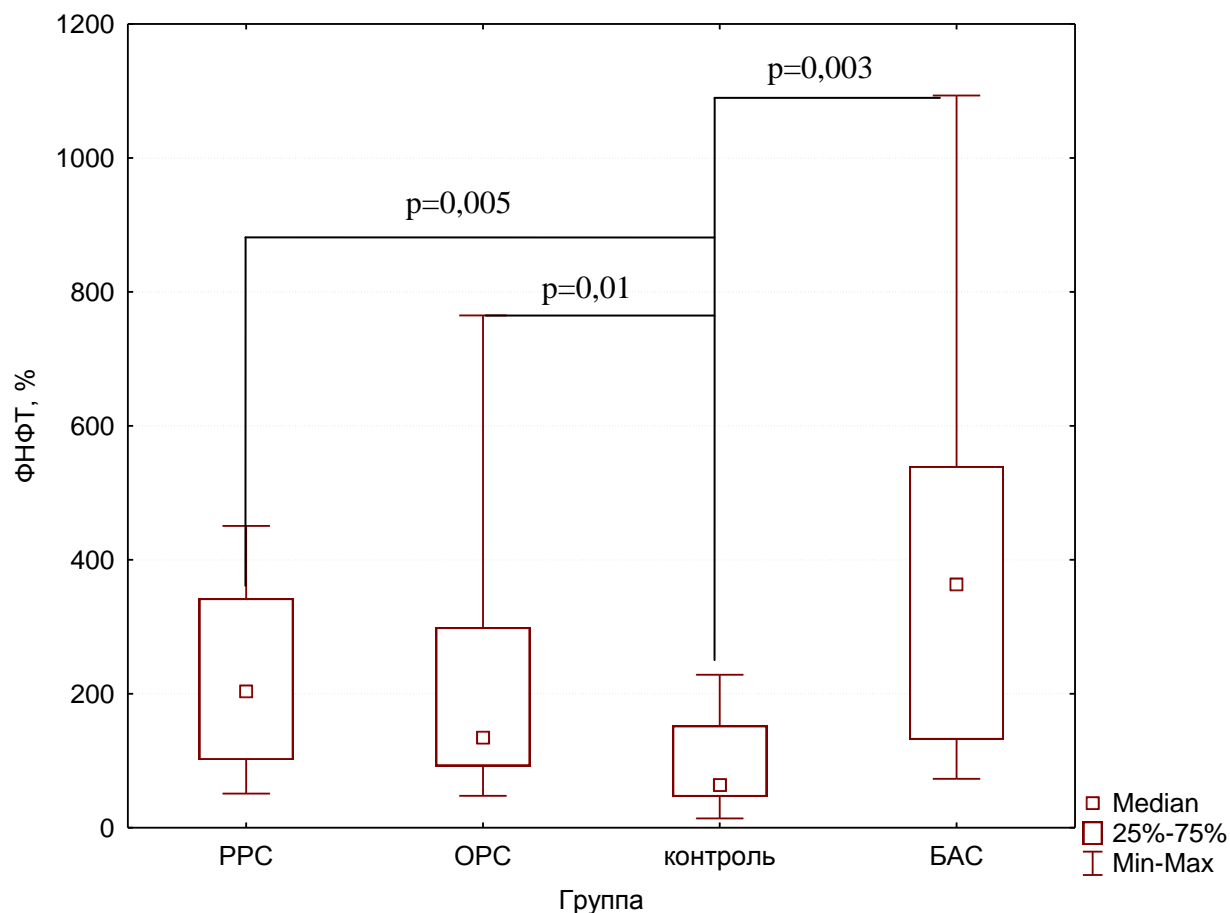
Работа была выполнена по модели поперечного (одномоментного) исследования в параллельных группах пациентов.

В первую очередь нами было проведено исследование влияния иммуномодулирующей терапии на уровень биомаркеров в группах РРС и ОРС: статистически значимой взаимосвязи между терапией ПИТРС первой линии и уровнем маркеров нейродегенерации выявлено не было. Учитывая данные результаты, дальнейшее исследование проводилось без выделения подгруппы пациентов, получающих терапию ПИТРС.

Исследование маркеров нейродегенерации в ЦСЖ и сыворотке крови

В группах РРС, 203,94 % [101,36; 342,83], и ОРС 134,85 % [92,19; 299,41], уровень ФНФТ был значимо выше, чем в контрольной группе, 63,72 % [46,28; 152,71]. При этом между собой группы ОРС и РРС значимо не отличались по данному параметру. Отличие выявлено между контрольной группой и БАС 363,42 % [131,54; 539,99]: уровень ФНФТ при БАС оказался более высоким, но с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений отличие оказалось незначимым. Группы ОРС и РРС по уровню ФНФТ между собой не отличались и не отличались значимо от группы БАС. При этом уровень ФНФТ в группе ОРС имеет тенденцию к более низкому значению в сравнении с группой БАС, $p=0,07$ (Рис. 1). Важно, что ФНФТ наиболее устойчивы к

Рисунок 1. Уровень ФНФТ в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.



действию протеаз и, соответственно, могут быть более точно детектированы в биологических жидкостях (Petzold et al, 2007).

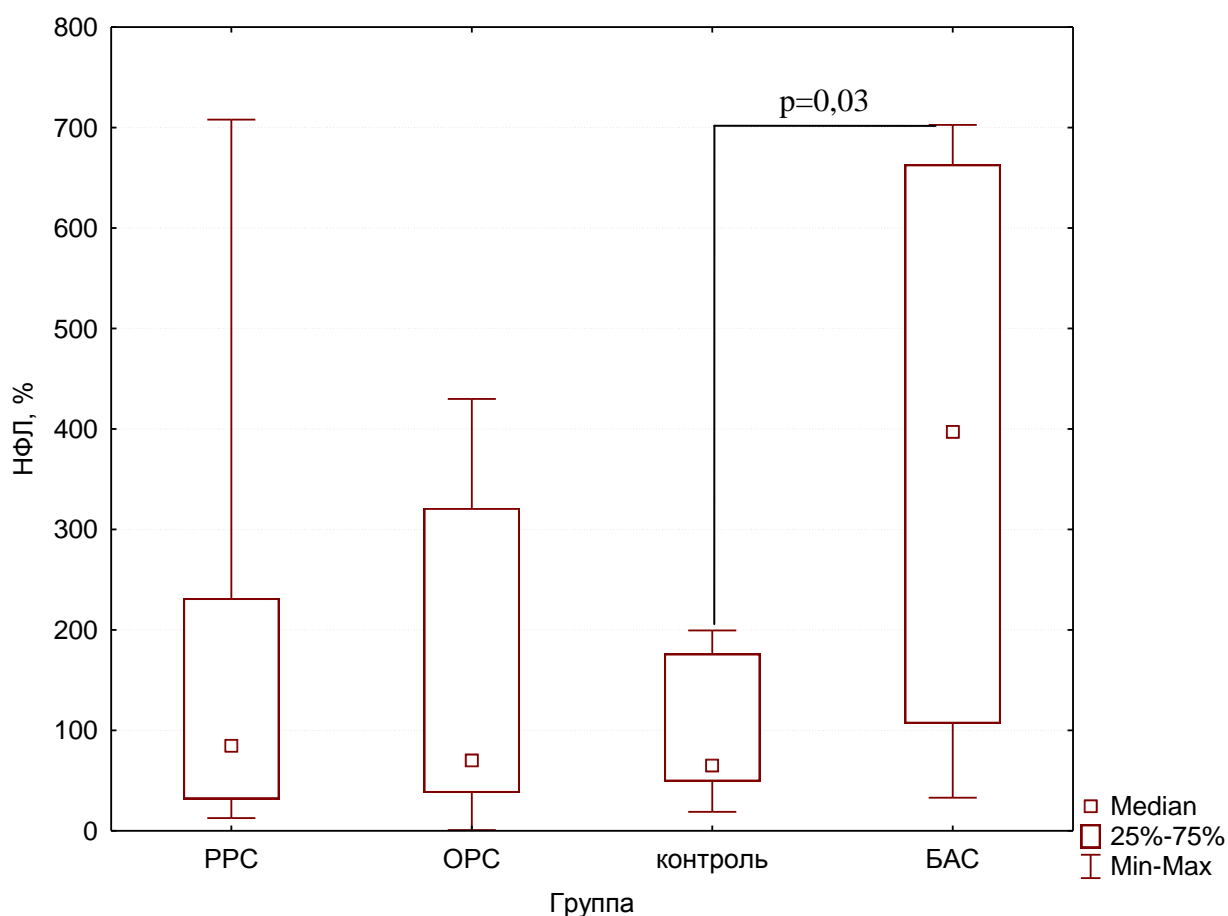
Степень фосфорилирования нейрофиламентов может меняться в процессе их метаболизма, а также вследствие патохимических процессов (Petzold, 2005). Нами были использованы наборы для детекции именно фосфорилированных в «нормальной» степени нейрофиламентов.

На основании этих данных справедливо предполагать, что аксонопатия на момент исследования имела место во всех трех исследуемых группах пациентов с неврологическими патологиями. При чем, выраженность процесса нейродегенерации в этих трех группах была одинаковой. В предыдущих исследованиях уровня ФНФТ в группах пациентов с РС и БАС было показано, что уровень данного маркера при БАС оказывается выше, чем при РС (Mattsson et al., 2009; Schirmer et al., 2011). Отсутствие такого отличия между группами в нашем исследовании можно объяснить ранней стадией заболевания у

большинства пациентов с БАС на момент выполнения люмбальной пункции. Надо отметить, что полученные нами результаты не противоречат ранее опубликованным: прослеживается тенденция к более высокому уровню ФНФТ в группе БАС в сравнении с РС и ОРС. Сравнимый же уровень ФНФТ в группах ОРС и РРС подтверждает, что нейродегенеративные изменения имеют место не только в острый период воспаления, но и продолжаются в период ремиссии. Ранее этот факт был подтвержден при морфологических и иммуногистохимических исследованиях (Craner et al., 2004).

По уровню НФЛ в исследованных группах значимых отличий выявлено не было. Однако была выявлена тенденция к более низкому уровню НФЛ при РРС, 84,62% [31,65; 231,65] и ОРС 70,14% [37,85;321,32] в сравнении с контрольной группой 65,02% [49,31; 176,37], $p=0,07$ (Рис. 2).

Рисунок 2. Уровень НФЛ в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.



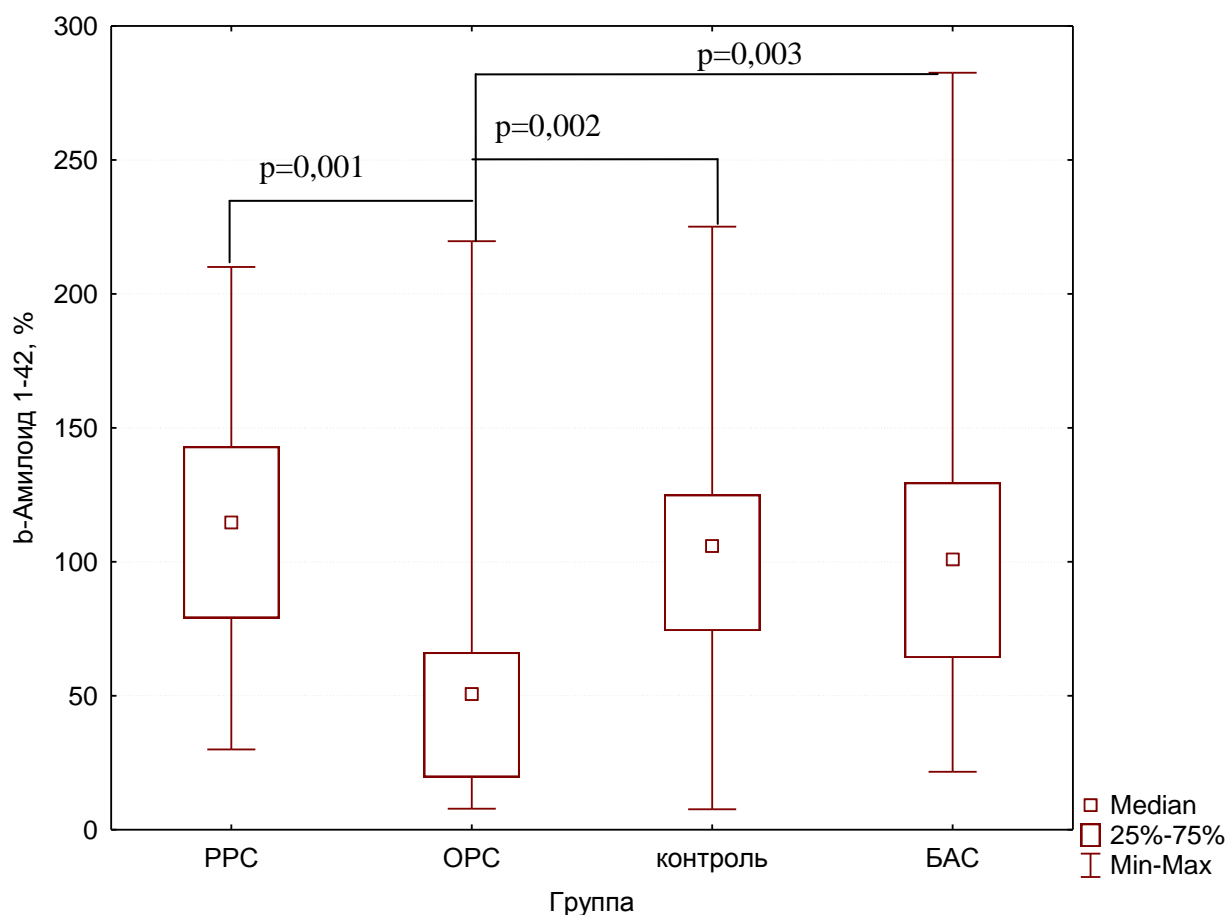
Полученное малое количество достоверных результатов по уровню данного маркера вероятно связано с меньшей стабильностью НФЛ в

биологических жидкостях, в отличие от ФНФТ. Однако полученные в настоящем эксперименте тенденции отражают большую выраженность процесса нейродегенерации в группе БАС и меньшую ее выраженность в группах РС, что согласуется с результатами полученными при изучении ФНФТ и с ранее выполненными работами. При сравнении результатов исследования уровня ФНФТ и НФЛ, уровень ФНФТ можно назвать более чувствительным маркером аксонального повреждения, способным отразить нейродегенеративные изменения не только при БАС, но и на ранних стадиях РС. Было выявлено, что уровень бета-амилоида 1-42 значимо ниже в группе ОРС 50,70 %[19,60; 66,28], в сравнении с группой РРС, 114,70 %[79,01; 143,07]. В группе ОРС уровень данного пептида ниже, чем в группе контроля, 105,87 %[74,21; 125,10], и группе БАС, 100,95 % [64,15; 129,63]. Группы РРС, БАС и контрольная группа между собой по уровню данного показателя не отличались (Рис. 3).

Белки бета-амилоидов являются продуктом ферментативного расщепления белка предшественника амилоида (БПА), трансмембранного белка экспрессируемого всеми клетками организма, в пределах ЦНС содержащегося преимущественно в стенках сосудов, в олигодендроцитах и нейронах (Gehrmannetal, 1995). Фермент, осуществляющий лизис БПА, также является трансмембранным протеином. Учитывая, что деструкция аксона является не только структурным распадом, но и сложным биохимическим процессом, исследование количественного содержания продуктов биохимической реакции, все исходные компоненты которой локализованы в мембране, представляется перспективным и информативным.

До недавнего времени патология метаболизма белков бета-амилоидов считалась специфическим признаком болезни Альцгеймера и даже рассматривалась как основа патогенеза данного заболевания. Однако развитие возможностей иммунохимии позволило расширить представления о БПА и роли его ферментативного метаболизма.

Рисунок 3. Уровень бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.



Основная роль данных протеинов в нормальной физиологии нервной системы остается невыясненной, но накопленные факты позволяют полагать, что бета-амилоиды участвуют в регуляции метаболических каскадов, межклеточном взаимодействии, влияют на скорость образования синаптических связей между нейронами. Имеющиеся данные о физиологии и биохимии БПА и бета-амилоидов не дают полного права называть их маркерами нейродегенерации, но служат основанием продолжать изучать их в данном контексте.

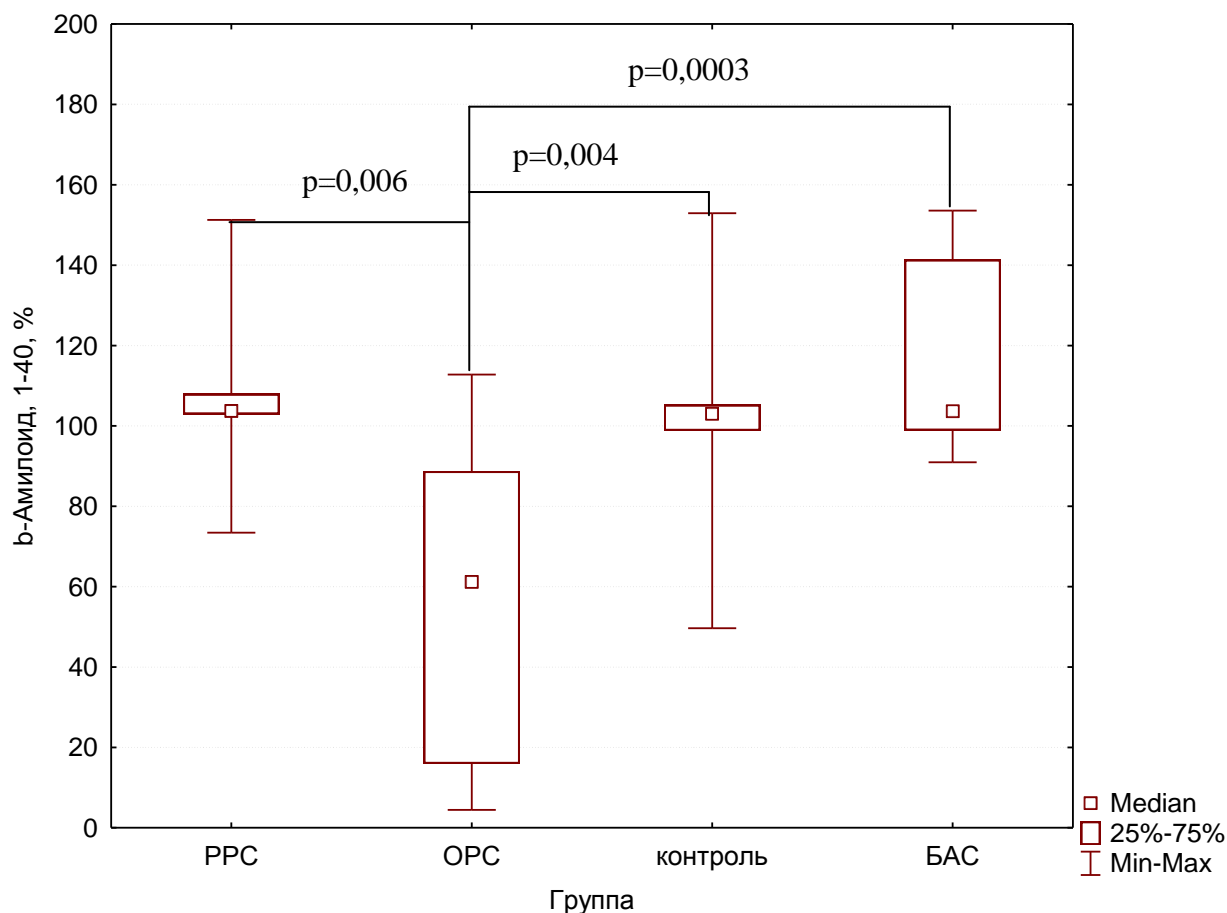
Выявленный при OPC более низкий уровень бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ в сравнении с PPC, контрольной группой и группой сравнения согласуется с ранее полученными результатами (Rossi et al., 2011), которые также выявляли снижение бета-амилоидов в ЦСЖ при PC, однако не связывали данное изменение с активностью процесса воспаления.

Основными симптомами болезни Альцгеймера являются нарушение памяти и когнитивные расстройства. Данная патология ассоциирована с

отложением нерастворимых бляшек бета-амилоида в межклеточном пространстве. Основным компонентом бляшек является белок бета-амилоид 1-42. Является ли отложение бета-амилоида причиной развития заболевания до настоящего времени остается невыясненным, однако данный протеин продолжает рассматриваться как возможная причина нарушения взаимодействия нейронов. Принимая во внимание снижение уровня бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ при обострении РС (изменение аналогичное выявленному при болезни Альцгеймера) нами было исследовано наиболее частое когнитивное нарушение, встречающееся при РС (нарушение скорости выполнения операций), и проведен анализ корреляции результатов теста с уровнем бета-амилоида 1-42. Корреляции баллов PASAT и уровня бета-амилоида 1-42 нами выявлено ни в группе OPC, ни в группе PPC не было. В ранее же проведенном исследовании была показана положительная корреляция балла по тесту PASAT и концентрации бета-амилоида 1-42 (Morietal., 2011). По приведенным характеристикам группа пациентов в исследовании Mori была сравнима с исследуемой нами по числу пациентов, их возрасту, но отличалась более выраженным неврологическим дефицитом (EDSS до 5). Вероятно, что нами данной корреляции получено не было ввиду включения в исследование пациентов на ранней стадии заболевания с менее выраженным неврологическим дефицитом.

Выявлено отличие групп OPC и PPC по уровню бета-амилоида 1-40: в обострении заболевания отмечается снижение концентрации бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ. В группе OPC уровень бета-амилоида 1-40 составил 61,15 % [15,97; 88,75], в группе же PPC – 103,73 % [102,92; 107,95]. Уровень бета-амилоида 1-40 в группе OPC был также значимо ниже, чем в контрольной группе 103,05 % [98,83; 88,75] и группе БАС 103,68 % [98,88; 141,36]. Группы PPC, БАС и контрольная группа по данному параметру между собой не отличались (Рис. 4). В целом, по уровню бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ были выявлены отличия близкие к полученным результатам по бета-амилоиду 1-42. Надо отметить, что

Рисунок 4. Уровень бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.



кратность снижения концентраций бета-амилоида 1-40 и бета-амилоида 1-42 также примерно одинаковые: по нашим результатам снижение уровня бета-амилоидов происходит в 2-3 раза в сравнении с остальными исследуемыми группами. Однако, данные маркеры нельзя считать абсолютно аналогичными. Амилоид 1-42 менее растворим и в большей степени участвует в формировании бляшек при болезни Альцгеймера, в то время как амилоид 1-40 чаще обуславливает амилоидную ангиопатию и локализуется в стенке сосудов.(Biffietal, 2011). Учитывая доказанность периваскулярной локализации бляшек РС и другие данные о вовлечении микроваскулярного русла в патогенез демиелинизирующих заболеваний (выявление антител к водным каналам астроцитов тесно ассоциированных с формирующими ГЭБ клетками сосудов, изменение характеристик венозного кровотока головного мозга у части пациентов с РС), нами и была отдельно изучена концентрация бета-амилоида 1-40. Из полученных результатов обращает внимание большой разброс значений

концентрации данного маркера в контрольной группе, что возможно объясняется вариабельностью состояния микроваскулярного русла у пациентов разного возраста, однако подтверждения данного предположения положительной корреляцией с возрастом пациентов получено не было.

Бета-амилоиды 1-40 и 1-42 образуются из БПА путем воздействия различных секретаз. Альфа-секретаза расщепляет БПА таким образом, что дальнейший метаболизм идет по не амилоидогенному пути. Трансмембранный фермент альфа-секретаза осуществляет расщепление БПА с формированием растворимого БПА 1-670, обладающего нейропротективной активностью, положительно влияющего на нейропластичность. БПА может быть также расщеплен трансмембранным ферментом бета-секретазой (BACE1, β -site APP-cleaving enzyme 1). В результате воздействия данного фермента формируются растворимый бета-БПА и остающийся в цитоплазме 99-аминокислотный фрагмент. Из бета-БПА при воздействии гамма-секретазы формируются бета-амилоиды 1-40 и 1-42.

Таким образом, предполагаемыми причинами снижения уровня продуктов расщепления БПА могут быть: снижение количества самого БПА в мембранах клеток, снижение ферментативной активности BACE1 и/или гамма-секретазы, ускорение элиминации бета-амилоидов 1-40 и 1-42.

Предположение о снижении количества экспрессируемого БПА опровергается данными о напротив его накоплении в мембране аксона при повреждении волокон и нарушении антероградного транспорта белков. Однако, нельзя исключить, что изменение физико-химических свойств фосфолипидной мембраны в условиях острого воспаления нарушают стерические и конформационные взаимоотношения субстрата и фермента и несмотря на их избыточное присутствие в мембране происходит снижение скорости их взаимодействия.

Возможно, это один из защитных механизмов включающихся при повреждении нервной ткани, направленный на активацию предполагаемой нейротрофической функции БПА: повышение жизнеспособности клеток,

миграционной активности и формированию большего количества синапсов. Компенсаторное же повышение экспрессии БПА и восстановление уровня бета-амилоидов может являться механизмом снижения активности Т-лимфоцитов и активированных микроглиальных клеток.

Вовлечение фермента BACE1 в патогенез демиелинизации подтверждается рядом ранее проведенных исследований. Было выявлено нарушение формирования миелиновой оболочки у мышей, нокаутированных по гену BACE1. В исследовании Mattsson с соавторами, 2009, при сравнении уровня бета-амилоида 1-42 в группе РС и в контрольной группе было получено достоверное отличие: уровень бета-амилоида при РС был ниже, чем в контрольной группе. Следует обратить внимание, что из 66 пациентов с РС, включенных в исследование, у 41 в течение последнего месяца перед выполнением люмбальной пункции было обострение заболевания. В том же исследовании было выявлено снижение активности фермента BACE1 в ЦСЖ при РС в сравнении с контрольной группой.

Подтвержденное нами снижение концентрации бета-амилоида 1-42 в фазу обострения РС имеет большое значение в контексте данных о том, что фермент BACE1 играет роль в миелинизации и ремиелинизации аксонов. Данный фермент расщепляет нейрегулин-1 в мембране аксона, что приводит к запуску каскада активации и формированию миелиновой оболочки олигодендроцитом (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). Возможно, что именно снижение активности фермента обуславливает неполноценную ремиелинизацию аксонов при демиелинизирующих заболеваниях.

Нами был проведен сравнительный анализ содержания маркеров нейродегенерации в группах РРС и ОРС. Было выявлено, что в стадию обострения в ЦСЖ происходит снижение уровней бета-амилоида 1-40 и 1-42. Уровень же ФНФТ и НФЛ в разные фазы заболевания значимо не отличался (Диаграмма 1).

По соотношению уровней маркеров значимые отличия были получены при исследовании соотношения бета-амилоида 1-42 и ФНФТ в ЦСЖ (Рис. 5).

Диаграмма 1. Уровень исследуемых маркеров в ЦСЖ при ОРС и РСР.

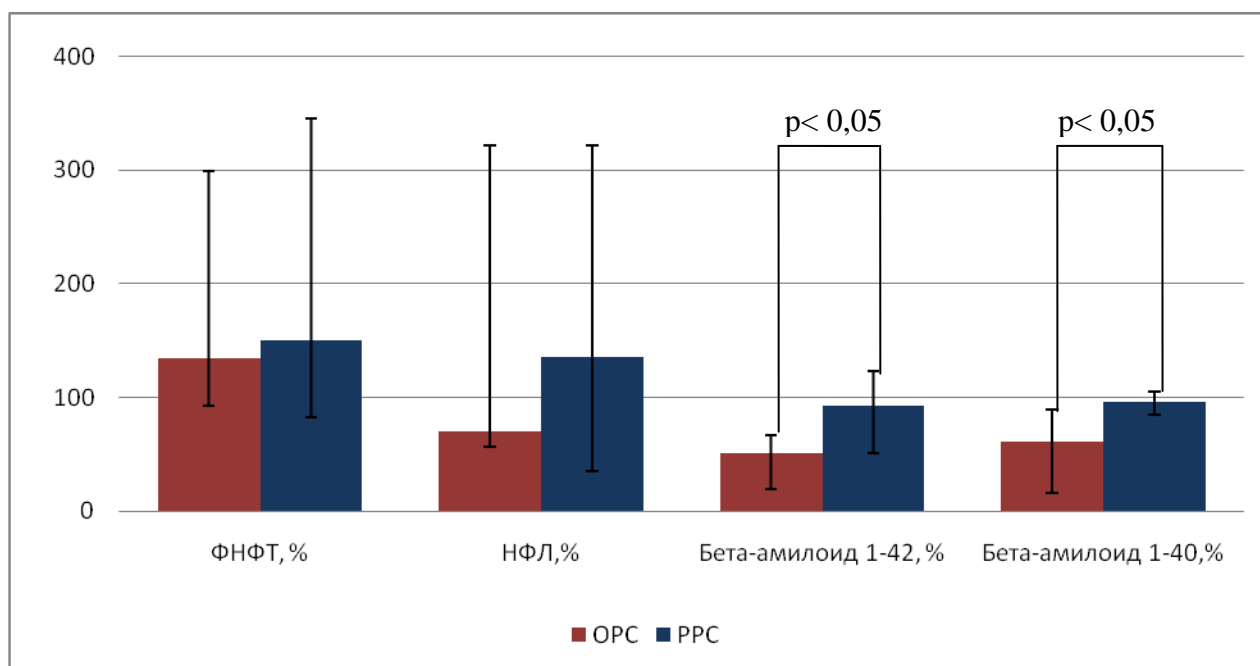
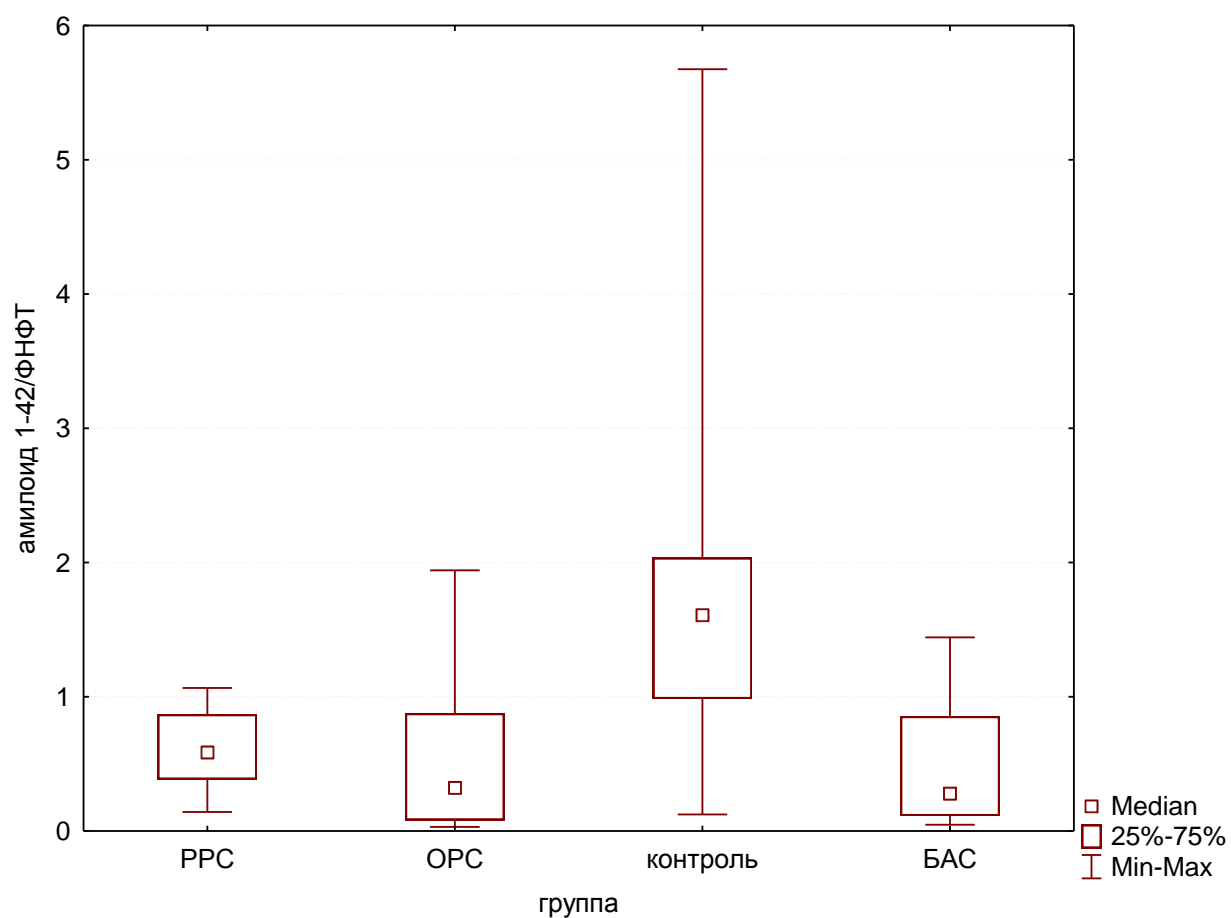


Рисунок 5. Соотношение бета-амилоида 1-42/ФНФТ в ЦСЖ.



Контрольная группа статистически значимо отличалась от остальных групп, причем можно детерминировать значение данного соотношения равное 1, позволяющее со специфичностью 83% разграничить группы контроля и пациентов с заболеваниями ЦНС. Чувствительность данного индекса, согласно нашему исследованию, равна 70%. Снижение данного индекса до 1 и менее характерно для начальных стадий нейродегенеративного процесса при РС и БАС. Данный индекс может быть применен как с научной целью, так и в клинической практике. С научной целью актуально было бы формирование групп больных с РС, характеризовавшихся четко отличными индексами и сравнение их по клиническим данным, данным дополнительных методов исследования (МРТ, оптическая когерентная томография, вызванные потенциалы различных модальностей и др). В практической деятельности настоящий индекс может помочь прогнозировать у пациента стойкий

неврологический дефицит, на более раннем этапе сосредоточить усилия на реабилитационных методах, возможно, избежать неоправданного применения цитостатической терапии.

Выявленные в группе пациентов с ОРС статистически значимые корреляции представлены в таблице 2.

Таблица 2. Статистически значимые корреляции маркеров
в группе пациентов с ОРС

	НФЛ	бета-амилоид 1-42, %	бета-амилоид 1-40, %
бета-амилоид1-42, %	-	-	0,6
бета-амилоид1-40, %	-	0,6	-
Белок ЦСЖ, г/л	-	- 0,6	- 0,7
EDSS	0,6	-	-

Значимого различия между выявленными корреляциями концентрации белка в ЦСЖ с уровнем бета-амилоида 1-40 и уровнем бета-амилоида 1-42

выявлено не было ($p=0,2$). В других исследованных группах указанных корреляции выявлено не было.

Полученная корреляция уровня НФЛ и оценки неврологического дефицита по шкале EDSS, указывает на верность предположения об информативности данного маркера и необходимости дальнейшего уточнения его значимости. Стоит отметить, что данная корреляция получена с EDSS, оцененным на момент обострения заболевания. Корреляции оценки неврологического дефицита по одной из функциональных систем с уровнем нейрофиламентов в ЦСЖ у больных с РС выявлено не было.

Нами была выявлена отрицательная корреляция концентрации белка в ЦСЖ и уровней бета-амилоида 1-42 и 1-40 в группе ОРС. Причем указанные корреляции с концентрацией белка статистически значимо друг от друга не отличались. С альбуминовым же индексом положительной корреляции ни для одного из амилоидов выявлено не было. Данный факт позволяет сделать вывод о том, что изменение концентрации бета-амилоида происходит не ввиду повышения проницаемости ГЭБ, а скорее по причине снижения активности отдельных протеолитических ферментов.

Выявленная нами корреляция уровней бета-амилоида 1-40 и 1-42 в группе пациентов с ОРС свидетельствует в пользу того, что это снижение происходит еще на этапе метаболизма БПА и/или бета-БПА. . На данный момент известны два фермента, участвующие в метаболизме обоих белков, это ВАСЕ1 и гамма-секретаза. Таким образом, исследование уровня обоих пептидов, бета- бета-амилоида 1-42 и бета-амилоида 1-40, позволяет предполагать, что причина изменения их концентраций в ЦСЖ при РС происходит именно путем уменьшения скорости их формирования ввиду снижения ферментативной активности данных секретаз.

Недавно было выявлено, что клетки-предшественники олигодендроцитов, специфическим мембранным маркером которых является хондроитин сульфат протеогликан, способны пролиферировать не только в клетки глии, но и в нейроны. Эти клетки-предшественники олигодендроцитов

участвуют в элиминации белков-амилоидов, поглощая протеины путем пиноцитоза. Активированные клетки микроглии и астроглии также могут участвовать в пиноцитозе белков-амилоидов. Таким образом, также одной из предполагаемых причин снижения уровня амилоидов 1-40 и 1-42 может быть повышенная активность глиальных клеток и их предшественников, активация этих клеток происходит всегда при остром воспалении. Таким образом, вероятно, изменение концентрации продуктов метаболизма БПА является звеном механизма с обратной отрицательной связью, поддерживающего стабильность аксонального волокна и нейроглиальных взаимодействий. Для более точного представления о его звеньях и разработки препаратов, влияющих на его этапы, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Нами были исследованы образы сыворотки больных указанных групп с целью определения в них концентраций ФНФТ, НФЛ, бета-амилоида 1-40 и 1-42. По уровню ФНФТ в сыворотке крови отличий между группами получено не было.

При определении НФЛ, бета-амилоида 1-40 и 1-42 оптическая плотность, детектируемая в ячейках с образцами сыворотки, была выше таковой в ячейках без добавления исследуемого антигена, но ниже плотности в ячейках с максимальным разведением соответствующего антигена, что свидетельствовало о крайне низкой, ниже предела детекции метода, концентрации исследуемого вещества.

Исследование аутоантител к белкам бета-амилоидов и цепям нейрофиламентов

При исследовании ЦСЖ и сыворотки крови на наличие антител к указанным антигенам нам не удалось достичь отличия оптической плотности проб от ячеек отрицательного контроля, что свидетельствует о неспецифическом связывании аутоантител. Также, вероятно, имеет место, напротив, высокая специфичность антител к бета-амилоидам 1-40, 1-42. Как было выявлено ранее, конформационные изменения данных протеинов могут быть причиной различий презентруемых антигенов.

ВЫВОДЫ

1. Нейродегенерация является одним из ключевых звеньев патогенеза рассеянного склероза, что подтверждается выявленными уже на раннем этапе развития заболевания патохимическими изменениями.
2. У больных рассеянным склерозом с легким неврологическим дефицитом (преимущественно до 4 баллов по шкале EDSS) и отсутствием выраженных когнитивных нарушений (преимущественно более 40 баллов по шкале PASAT) не выявлены достоверные корреляции уровня маркеров нейродегенерации со степенью выраженности неврологических нарушений.
3. Наиболее чувствительным маркером нейродегенерации на ранних стадиях рассеянного склероза является уровень фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости. Повышение уровня фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости в периоды ремиссии и обострения отражает непрерывность нейродегенерации при ремиттирующем течении рассеянного склероза. Уровень легких цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости отражает нейродегенеративный процесс при боковом амиотрофическом склерозе, при рассеянном склерозе уровень данного маркера на ранних стадиях заболевания не меняется.
4. Снижение уровня бета-амилоидов 1-40 и 1-42, в цереброспинальной жидкости в стадию обострения при РС подтверждает специфичность мембрано-ассоциированных метаболических процессов для активной фазы заболевания.
5. Уровень исследованных маркеров не связан с проницаемостью гемато-энцефалического барьера, определенной по альбуминовому индексу.
6. При рассеянном склерозе снижение соотношения уровня бета-амилоида 1-42 к уровню фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов может

служить маркером начальной стадии нейродегенерации со специфичностью 83% и чувствительностью 70%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты позволяют обосновать необходимость биохимического исследования цереброспинальной жидкости пациентов с рассеянным склерозом для выяснения выраженности нейродегенерации в конкретном клиническом случае.
2. При получении результатов анализа цереброспинальной жидкости, свидетельствующих о выраженной невоспалительной аксонопатии, следует иметь в виду высокую вероятность необратимости неврологического дефицита при планировании иммуносупрессивной терапии и реабилитационных мероприятий.
3. В последующем пациентам с выраженной невоспалительной аксонопатией кажется целесообразным назначение наиболее эффективных иммуномодуляторов (в том числе иммуномодуляторов второй линии), так как после каждого нового обострения регресс симптомов с высокой вероятностью будет неполным.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Воробьева А.А., Иванова М.Н., Фоминых В.В., Захарова М.Н., Зигангирова Н.А., Гуляева Н.В. Биомаркеры при рассеянном склерозе // **Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова.** – 2013. №113.- С. 23-31.
2. А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, М.В. Онуфриев, М.Н. Захарова, Н.В. Гуляева Использование тяжелых цепей фосфорилированных нейрофиламентов в качестве маркера нейродегенерации при демиелизирующих заболеваниях ЦНС // **Нейрохимия.** – 2014. - №3. - С. 254–259.
3. Симанив Т.О., Второва Н.В., Воробьева А.А., Зигангирова Н.А., Захарова М.Н. Диагностическое значение антител к аквапорину – 4 при заболеваниях центральной нервной системы // **Нейрохимия.** – 2014. - №3. - С. 246–253.

4. Воробьева А.А., Фоминых В.В., Второва Н.В., Гуляева Н.В., Зигангирова Н.А., Захарова М.Н. Биохимические маркеры демиелинизирующих заболеваний. // Медицинский академический журнал. – 2012. - № 4.-С.26-28.
5. Воробьева А.А., Фоминых В.В., Второва Н.В., Гуляева Н.В., Зигангирова Н.А., Захарова М.Н. Биохимические маркеры демиелинизирующих заболеваний ЦНС // Материалы VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции, Новосибирск. – 2013. - С.36-41.
6. Vorobyeva A., Fominykh V.V., Vtorova N., Gulyaeva N.V., Zigangirova N.A., Zakharova M.N. Biochemical markers of CNS demyelinating diseases // Journal of the Neurological Sciences. 2013. Vol. 333, No. 1.
7. Vorobyeva, V. Fominykh, M. Zakharova, N. Gulyaeva Biochemical markers of neurodegeneration in multiple sclerosis // Session Multiple Sclerosis Journal. 2013. Vol. 19, No 11

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАС – боковой амиотрофический склероз
БПА – белок предшественник амилоида
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ИФА – иммуноферментный анализ
МРТ – магнитно-резонансная томография
НФЛ – легкие цепи нейрофиламентов
ОРС – обострение РС
ПИТРС – препараты, изменяющие течение РС
РРС – ремиссия РС
РС – рассеянный склероз
ФНФТ – фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламентов
ЦНС – центральная нервная система
ЦСЖ – церебро-спинальной жидкость
ЭНМГ – электронейромиография
ALS FRS-R – Revised ALS functional rating scale
BACE1 – β -site APP-cleaving enzyme 1
EDSS – Expanded Disability Status Scale
PASAT – paced auditory serial addition test