

Глутаматная эксайтотоксичность при рассеянном склерозе

А.А. Рязанцева, В.М. Алифирова, С.А. Иванова, А.С. Бойко, Н.М. Кротенко

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
ФГБУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Сибирского отделения РАМН (Томск)

Проведен сравнительный анализ уровня нейроактивной аминокислоты глутамата в сыворотке крови у 17 практически здоровых лиц и у 63 пациентов с рассеянным склерозом (РС) в зависимости от типа течения, стадии, длительности заболевания и инвалидизации. Уровень глутамата оказался достоверно выше у больных РС ($16,47 \pm 4,37$ нмоль/мкл) в сравнении со здоровыми лицами ($11,31 \pm 3,08$ нмоль/мкл). При ремиттирующем типе РС он был увеличен на 43,4 %, при вторично-прогрессирующем – на 45,3 %, при первично-прогрессирующем – на 66,3%. При эксацербации заболевания концентрация глутамата достигала максимальных значений ($18,44 \pm 3,44$ нмоль/мкл) в сравнении с ремиссией ($15,12 \pm 3,97$ нмоль/мкл). Достоверных изменений уровня глутамата в зависимости от длительности заболевания и степени выраженности инвалидизации выявлено не было. Полученные результаты могут быть использованы как один из дополнительных диагностических критериев для определения стадии заболевания, а контроль над уровнем глутамата может стать новой терапевтической мишенью при РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, глутамат, эксайтотоксичность

Рассеянный склероз – хроническое прогрессирующее воспалительно-дегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), характеризующееся образованием множественных очагов демиелинизации, поражающее лиц молодого трудоспособного возраста и быстро приводящее их к инвалидизации [2, 3, 9]. На сегодняшний день доказано, что РС является мультифакторным аутоиммунным заболеванием [5, 10, 11, 13, 19], хотя до сих пор не решен вопрос о первичности поражения нервной и иммунной систем [1]. С одной стороны, эти системы имеют высокую степень автономности, а с другой – характеризуются тесными и сложными двусторонними взаимодействиями, в основе которых находятся биохимические процессы [1]. Установлено, что при РС имеет место патология нейрональной трансмиссии, обусловленная, главным образом, глутаматом и его нейроактивными метаболитами, с развитием эксайтотоксического повреждения нейрональных структур, реакцией окислительного стресса, индукцией активаторов патологического апоптоза и клеточной гибели [3–5].

Эксайтотоксичность рассматривается в качестве одного из важных патогенетических звеньев при многих аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях. Помимо «классического» механизма эксайтотоксичности выделяют также «медленную» или «метаболическую» эксайтотоксичность [18, 20]. Эта форма нейродегенерации может иметь место при нормальных, не повышенных концентрациях глутамата, но при сниженном энергетическом статусе клетки. В этом случае роль триггера патологических процессов играет нарушение АТФ-продуцирующей функции митохондрий, что приводит к понижению уровня активности АТФ-зависимых ферментов, в частности Na/K-АТФаз, ответственных за поддержание мембранного потенциала клетки. Как результат, происходит медленная деполяризация мембраны клетки, снятие магниевого блока NMDA-рецепторов. При этом излишнее поступление ионов кальция в клетку активирует ряд ферментов (фосфолипаз, эндонуклеаз, протеаз (кальпаины)), разрушающих цитозольные структуры, и приводит к запуску апоптоза клетки. В качестве эксайтотоксинов могут выступать L-глутамат и глутаматомиметики (α -амино-метилизоксазолпропионат,

виллардин, каинат, квисквалат, N-метил-D-аспартат, метилглутамат и ряд других веществ) [17].

На сегодняшний день установлена роль глутамата в передаче нервных импульсов через глутаматергические синапсы по всему мозгу и участие его во многих процессах. Глутаматная система – самая мощная трансмиссионная система мозга; более 40% всех синапсов мозга – глутаматные, т.е. возбуждающие. Глутамат является основной возбуждающей аминокислотой в ЦНС. Глутаматергические нейроны были обнаружены в коре больших полушарий, обонятельной луковице, гиппокампе, черной субстанции, мозжечке, сетчатке [1, 17, 19]. Кроме того, глутаматергические окончания обнаружены также в миндалине, стриатуме, на клетках-зернах мозжечка [17, 18]. Общеизвестным является также тот факт, что глутамат – основной нейромедиатор задних рогов спинного мозга. Глутамат присутствует в 30–40% всех синапсов головного мозга, из них 80–90% расположены в тех областях мозга, которые участвуют в когнитивной обработке – коре головного мозга и гиппокампе [18, 20]. Ранее сообщалось, что уровень глутамата увеличивался в цереброспинальной жидкости пациентов с ремиттирующим и вторично-прогрессирующим РС, а также в сыворотке крови до наступления клинического рецидива [19].

В России были проведены исследования, в которых было доказано, что данная аминокислота может выступать в роли сильного нейротоксина, способствуя эксайтотоксическому повреждению нервных клеток [1, 3]. У больных РС показано достоверное повышение содержания в крови возбуждающих аминокислот аспартата и глутамата, а также тормозной аминокислоты таурина. При этом отмечена тесная связь повышения уровня этих медиаторных аминокислот с тяжестью неврологического дефицита, течением болезни и топикой поражения супраспинальных и спинальных нисходящих двигательных систем [1, 3].

Несмотря на интенсивные исследования в нейробиологии, молекулярной биологии, иммунологии и генетике, этиология и патогенез РС остаются невыясненными, также до сих пор нет ответа на вопрос о том, что является причиной возникновения обострений. Согласно одной из имеющих-

ся точек зрения, РС не является болезнью иммунной системы [12]. Поэтому рассмотрение метаболических нарушений при данном заболевании заслуживает особого внимания.

Пациенты и методы

Нами обследованы 63 пациента (61,1% женщин и 38,9% мужчин) с достоверным диагнозом РС [15, 16], находящихся под наблюдением в неврологической клинике Сибирского государственного медицинского университета. Средний возраст больных на момент обследования составлял 36,5 лет (от 17 до 59 лет), средний возраст начала заболевания – 30,1 лет (12–47), длительность заболевания – 10,4 лет (от 1 года до 19 лет). В качестве контрольной группы для лабораторных исследований были включены 17 практически здоровых лиц (6 мужчин, 11 женщин) в возрасте от 17 до 60 лет. Критериями исключения из программы обследования для здоровых лиц и больных РС являлись: возраст моложе 17 и старше 60 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; наследственные и психические болезни, злокачественные новообразования, алкогольная и наркотическая зависимости; отсутствие информированного согласия.

Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом. В соответствии с международными критериями диагностики РС, у 46 (73 %) больных диагностирован ремиттирующий тип течения болезни (РРС), у 11 (17,5%) – вторично-прогрессирующий РС (ВПРС), у 6 (9,5%) – первично-прогрессирующий РС (ППРС). Среди обследованных с РРС в стадии ремиссии наблюдались 26 пациентов, в фазе обострения болезни – 20. Средний возраст пациентов с РРС составил 37 лет (17–59), с ВПРС – 45 лет (26–59) и с ППРС – 51 год (37–57). Средний возраст дебюта – 21,45±6,78 лет. Самым частым симптомом дебюта РС были зрительные нарушения (25 чел. – 39,7%), на втором месте оказались пирамидные расстройства (18 пациентов – 28,6%). Достаточно часто болезнь манифестировала поражением чувствительных структур (16 больных – 25,4%). Реже встречались мозжечковые нарушения (4 пациента – 6,34%). Выраженность неврологического дефицита оценивалась путем определения суммы баллов неврологического дефицита (шкала FS) и степени инвалидизации (шкала EDSS).

Кровь для биологических исследований брали из локтевой вены утром, натощак. Концентрацию глутамата в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом при $\lambda=450$ нм, используя наборы реагентов Glutamate Assay Kitt (BioVision, США). Принцип метода основан на окислении глутаминовой кислоты в глутаматдегидрогеназной реакции до альфа-кетоглутарата с выделением NADH, который, взаимодействуя с реагентом, изменяет окраску реакционной смеси, что регистрируется на спектрофотометре при указанной выше длине волны. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию глутаминовой кислоты в исследуемых образцах сыворотки крови. Концентрацию глутаминовой аминокислоты в образцах сыворотки выражали в нмоль/мкл.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica, версия 6.0 для Windows (StatSoft.Inc., 2001). Выборки проверя-

ли на нормальность распределения по критерию Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента и с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В работе было установлено, что показатели глутамата при РС статистически значимо выше ($16,47 \pm 4,37$ нмоль/мкл) в сравнении со здоровыми лицами ($11,31 \pm 3,08$ нмоль/мкл, $p=0,000019$). Это согласуется с ранее полученными данными [6]. Увеличение концентрации глутамата в сыворотке крови больных РС было единообразным при разных типах и стадиях течения заболевания – например, как у пациентов с ППРС, так и в стадии обострения при других типах течения заболевания. Уровень глутамата у пациентов, страдающих РРС, был увеличен на 43,4% относительно показателей в контрольной группе, при ВПРС – на 45,3%, при ППРС – на 66,3%. Межгрупповых отличий в концентрации глутамата при РРС и ВПРС выявлено не было. Наряду с этим наиболее высокий уровень глутаматной эксайтотоксичности, обнаруженный при ППРС, вероятно всего, связан с высоким темпом нарастания как воспалительных, так и нейродегенеративных процессов, что в свою очередь приводит к высокой степени инвалидизации и является плохим прогностическим признаком.

Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

таблица 1: Концентрация глутамата в сыворотке крови больных РС в зависимости от различных типов течения заболевания (M±SD).

Концентрация глутамата	Здоровые лица n=17	Все группы РС n= 63	РРС n=46	ВПРС n=11	ППРС n=6
Глутамат, нмоль/мкл	11,31±3,08	16,47±4,37	16,23±4,13	16,45±5,76	18,83±3,65
P (U-тест)	–	$p=0,000019$	$p=0,002509$	$p=0,035846$	$p=0,000169$

таблица 2: Концентрация глутамата в сыворотке крови в зависимости от стадии РС (M±SD).

Концентрация глутамата	Здоровые лица n=17	Больные РС: ремиссия n=26	Больные РС: обострение n=20
Глутамат, нмоль/мкл	11,31±3,08	15,12±3,97	18,44±3,44
P (U-тест)	–	$P=0,001807$	$P=0,004796$ $P<0,000001$

Примечание: P – достоверность различий значений при сравнении с группой контроля; P₁ – достоверность различий между показателями пациентов в состоянии ремиссии и при обострении.

Клиническими признаками ремиссии считались: улучшение состояния больного в виде уменьшения выраженности или исчезновения симптомов длительностью не менее 1 месяца. Критериями обострения являлись: появление новой неврологической симптоматики, выявляемой при клиническом обследовании и сохраняющейся не менее 24 часов. Было установлено, что при обострении концентрация глутамата в сыворотке крови по отношению к контролю увеличена на 63,04% (в 1,63 раза), а в стадии ремис-

сии – на 33,68% (в 1,34 раза). При межгрупповом сравнении показателей глутамата у больных в стадии обострения или ремиссии было выявлено, что при эксацербации уровень глутамата статистически значимо выше ($18,44 \pm 3,44$ нмоль/мкл, $p < 0,000001$), чем в фазе ремиссии ($15,12 \pm 3,97$ нмоль/мкл, $p = 0,001807$). Это доказывает, что активный аутоиммунный процесс, запускающий целый каскад воспалительных изменений (в т.ч. феномен эксайтотоксичности), протекают параллельно, что подтверждает комплексное взаимодействие иммунной и нервной систем.

Высокий уровень глутамата у больных РС наблюдается уже в дебюте заболевания, максимально увеличен в стадии эксацербации и сохраняется на всем протяжении заболевания. Вместе с тем, имеются периоды колебания концентрации глутамата в зависимости от естественного течения болезни. Самое значительное увеличение концентрации глутамата имеет место во время рецидива РС, что может служить диагностическим критерием для определения стадии заболевания.

В ходе исследования одновременно оценивалась концентрация глутамата в зависимости от степени тяжести по шкале EDSS [14]. Все пациенты были разделены на две группы: с легкой и тяжелой степенями поражения. Градация осуществлялась следующим образом: легкая степень EDSS – до 3,5 баллов, тяжелая степень EDSS – от 4 до 9 баллов. Сорок три (68,25%) пациента составили группу с легкими проявлениями по шкале EDSS, 20 (31,75%) – с тяжелыми. Установлено, что показатели глутамата ($11,31 \pm 3,08$ нмоль/мкл) были статистически значимо выше по сравнению группой контроля. Вместе с тем, значимых различий между группами с различной степенью тяжести не установлено. Важной являлась оценка длительности заболевания. В анализируемой группе 40 пациентов имели длительность болезни до 10 лет, а 23 – более 10. Показано, что концентрация глутамата значимо не различается у пациентов с различной длительностью заболевания. Таким образом, увеличенный уровень глутамата в сыворотке крови у пациентов с РС не зависел ни от степени инвалидизации, ни от стажа заболевания (табл. 3).

Список литературы

1. Бархатова В.П., Пантелеева Е.А., Алферова В.П. и др. Нейротрансмиттерные механизмы двигательных нарушений при рассеянном склерозе. Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова 2007; 2: 43–48.
2. Бойко А.Н., Столярков И.Д., Сидоренко Т.В. и др. Патогенетическое лечение рассеянного склероза: настоящее и будущее. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2009; 2: 90–99.
3. Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н. Рассеянный склероз. М.: Реал Тайм, 2011.
4. Демакова Е.В. Изучение уровня нейротрансмиттеров в сыворотке крови у больных рассеянным склерозом. Объединенный научный журн. 2001; 20: 28–32.
5. Завалишин И. А., Захарова М. Н. Рассеянный склероз: основные аспекты патогенеза. В кн: Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко (ред.). Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. М.: Миклош, 2004: 60–74.
6. Иванова Е.М., Барабанова М.А., Музлаев Г.Г. и др. Аминокислоты в сыворотке крови у больных рассеянным склерозом.

таблица 3: Концентрация глутамата в сыворотке крови больных РС в зависимости от длительности заболевания и степени тяжести по шкале EDSS (M±SD).

Концентрация глутамата	Здоровые лица n=17	Легкая степень (EDSS до 4) n=43	Тяжелая степень (EDSS свыше 4) n=20	Длительность заболевания до 10 лет n=40	Длительность заболевания больше 10 лет n=23
Глутамат, нмоль/мкл	11,31±3,08	16,64±4,20	16,11±4,79	16,52±4,71	16,38±3,80
P (U-тест)	–	P ₁ =0,6566 P=0,000015	P=0,001154	P ₁ =0,904 P=0,000106	P=0,000061

Примечание: P – достоверность различий по сравнению с группой контроля; P₁ – достоверность различий при сравнении групп между собой; легкая степень EDSS – до 3,5 баллов; тяжелая степень EDSS – от 4 до 9 баллов.

Установленное более высокое содержания глутамата в сыворотке крови в фазу обострения РС по сравнению с ремиссией указывает на активацию данного нейротрансмиттера и может позволить использовать концентрацию глутамата в качестве одного из биохимических маркеров для определения стадии заболевания. Высокая концентрация глутамата при эксацербации, вероятно, вызвана наиболее тяжелыми метаболическими изменениями, в частности, реакциями окислительного стресса, развитием синдрома эндогенной интоксикации и др. [8]. Следствием эндотоксикоза является усугубление течения заболевания [4–8].

Таким образом, в работе подтверждена негативная роль глутаматной эксайтотоксичности в прогрессировании демиелинизации и нейродегенеративных изменений при РС. Комплексное исследование показателей глутаматного обмена при РС позволяет расширить представления о патогенезе болезни, определить ранние диагностические биомаркеры патологического процесса, а также обосновать патогенетические принципы комплексной нейрометаболической терапии. Контроль над уровнем глутамата может стать новой терапевтической мишенью при РС.

7. Кротенко Н.М., Алифиорова В.М., Рязанцева А.А. и др. Молекулы средней массы и антитела к нативной и денатурированной ДНК у пациентов при различных типах течения рассеянного склероза. Фундаментальные исследования 2012; 5: 305–310.
8. Кротенко Н.В., Смирнова Л.П., Кротенко Н.М. и др. Окислительный стресс у пациентов с ремиттирующей и вторично-прогрессирующей формами рассеянного склероза. Неврол. журн. 2010; 6: 26–29.
9. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз. М.: Медицина, 2010.
10. Bush W.S., DeJager P.L., Dudek S.M. et al. A knowledge-driven interaction analysis reveals potential neurodegenerative mechanism of multiple sclerosis susceptibility. Genes Immun. 2011; 12: 335–340.
11. Callier S., Barcellos L.F., Baranzini S.E. et al. Osteopontin polymorphisms and disease course in multiple sclerosis. Genes Immun. 2008; 4: 312–315.

12. *Corthals A.P.* Multiple sclerosis is not a disease of the immune system. *Quart. Rev. Biol.* 2011; 86: 287–321.
13. *Groom A.J., Smith T., Turski L.* Multiple sclerosis and glutamate. *Ann. NY Acad. Sci.* 2003; 993: 229–275.
14. *Hughes S., Spelman T., Trojano M. et al.* The Kurtzke EDSS rank stability increases 4 years after the onset of multiple sclerosis: results from the MSBase Registry. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2012; 83: 305–310.
15. *Kurtzke J.F.* The diagnosis of multiple sclerosis (ed. C.M. Poser). NY: Thieme-Stratton, 1984: 3–13.
16. *McDonald W., Compston A., Edan G. et al.* Recommended Diagnostic Criteria for Multiple sclerosis: Guidelines from the

- International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* 2010; 50: 121–127.
17. *Pin J.P.* The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 2005; 34: 1–26.
18. *Popratiloff A., Weinberg R.* AMPA receptor subunits underlying terminals of fine-caliber primary afferent fibers. *J. Neurosci.* 2006; 16: 3363–3372.
19. *Sarchielli P., Greco L., Floridi A. et al.* Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 8: 1082–1088.
20. *Tovar K.R., Westbrook G.L.* Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 2002; 34: 255–264.

Glutamate excitotoxicity in multiple sclerosis

A.A. Ryazantseva, V.M. Alifirova, S.A. Ivanova, A.S. Boyko, N.M. Krotchenko

*Siberian State Medical University, Ministry of Health;
Research Institute for Mental Health, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk)*

Key words: multiple sclerosis, glutamate, excitotoxicity

A comparative analysis of the level of neuroactive amino acid glutamate in the blood serum of 17 healthy individuals and 63 patients with multiple sclerosis (MS), according to the course, stage and duration of the disease and disability, was performed. The level of glutamate was significantly higher in MS patients (16.47 ± 4.37 nmol/ μ l) compared to healthy individuals (11.31 ± 3.08 nmol/ μ l). It was increased by 43.4% in relapsing-remitting type of MS, by 45.3% in secondary progressive MS, and by 66.3% in primary progressive MS. In

exacerbation of the disease, glutamate concentration reached maximum values (18.44 ± 3.44 nmol/ μ l) compared to remission (15.12 ± 3.97 nmol/ μ l). No significant changes in the levels of glutamate depending on the duration of illness and severity of disability were found. The obtained results can be used as one of additional diagnostic criteria for determining the disease stage, and control over the level of glutamate may become a new therapeutic target in MS.

Контактный адрес: Рязанцева Анастасия Александровна – асп. каф. неврологии и нейрохирургии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. 634050, Томск, просп. Ленина, д. 107. Тел.: +7 (3822) 905-348, факс: +7 (3822) 53-20-50; e-mail: Nervanastasia@mail.ru;

Алифинова В.М. – зав. каф. неврологии и нейрохирургии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России;

Иванова С.А. – зав. лаб. молекулярной генетики и биохимии ФГБУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Сибирского отделения РАМН;

Бойко А.С. – лаборант-исследователь лаб. молекулярной генетики и биохимии ФГБУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Сибирского отделения РАМН;

Кротченко Н.М. – доц. каф. нормальной физиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.