

На правах рукописи

ЕНГАЛЫЧЕВА

Мария Германовна

**АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ И УРОВЕНЬ
КАРБОНИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И
ДЕМЕНЦИИ СОСУДИСТОГО ГЕНЕЗА**

03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Короткова Наталья Васильевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Петров Дмитрий Сергеевич

Официальные оппоненты:

Давыдов Вадим Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета

Шумаев Константин Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в _____ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Зорин Р.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Болезнь Альцгеймера (БА) и деменция сосудистого генеза (ДСГ) занимают лидирующие позиции среди причин слабоумия в старческом возрасте. Выявление биохимических механизмов БА и ДСГ необходимо для построения единой концепции патогенеза, динамического наблюдения за состоянием больных и поиска эффективных медикаментозных средств лечения (Nasrabad S. et al., 2018; Rochoy M. et al., 2019). Поиск периферических маркеров БА (например, в плазме и форменных элементах крови) является актуальной проблемой современной биохимии (Achili C. et al., 2018; Lashley T. et al., 2018). Ткани головного мозга изолированы от системного кровотока за счет наличия гематоэнцефалического барьера, однако при БА и ДСГ его проницаемость существенно повышена, патологические процессы, происходящие в нейронах, коррелируют с изменениями метаболизма в периферических клетках крови (Lewczuk P. et al., 2018; Blennow K. et al., 2019).

Степень разработанности темы

Доказано участие катепсинов в метаболизме таких нейрональных белков, как белок предшественник амилоида (APP) и тау-протеин, играющих ключевую роль в развитии БА (Paushter D.H. et al., 2018; Rusmini P. et al., 2019). Катепсин В - один из ферментов, участвующих в регуляции количества Аβ-пептидов (Stoka V. et al., 2016; Андреева Т.В. и др., 2017). Сведений о вкладе в развитие БА других цистеиновых протеиназ (катепсинов L, H), в т. ч. в лейкоцитах крови, в литературе практически не встречается. Вовлечение катепсинов в патогенез ДСГ изучено незначительно. В эксперименте было установлено, что в тканях гиппокампа мышей при моделировании у них ДСГ, возрастает активность катепсина В (Liu Z. et al., 2015).

Окислительный стресс (ОС) развивается и при БА, и при ДСГ (Birnbau J.H. et al., 2018; Butterfield D.A. et al., 2019). Причиной повышения уровня продуктов карбонилирования белков при БА является посттрансляционная окислительная модификация белков (ОМБ), и интенсивная протеолитическая

деструкция (Jiang T. et al., 2016; Cenini G. et al., 2019). Дубининой Е.Е. с соавт. изучался уровень продуктов ОМБ плазмы крови пациентов с БА (Дубинина Е.Е. и др., 2007; Дубинина Е.Е. и др., 2015). В современных библиографических источниках почти не встречается упоминаний об уровне ОМБ, а также взаимосвязи его с активностью протеиназ, в клетках крови при БА и ДСГ.

Накопление продуктов окислительной модификации макромолекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот), а также дериватов, образующихся в ходе нарушенного при НД метаболизма, приводит к развитию синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ) (Takeda S. et al., 2015; Узбеков М.Г. и др., 2016). Одним из показателей выраженности ЭИ является уровень веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) (Алферова В.В. и др., 2011; Карпищенко А.И., 2013). Хотя этот показатель не является специфическим и строго патогномичным, определение его в комплексе с другими биохимическими маркерами позволяет сформировать представление о глубине нарушения метаболических процессов, а также выявить взаимосвязь между выраженностью ОС и активностью протеиназ.

Цель исследования

Изучить состояние системы лизосомальных цистеиновых протеиназ в плазме и различных фракциях лейкоцитов крови во взаимосвязи с карбонилированием белков и уровнем эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.

Для осуществления цели поставлены следующие **задачи исследования:**

1. Изучить активность катепсинов Н, В, L в плазме и фракционированных лейкоцитах крови пациентов с болезнью Альцгеймера и деменцией сосудистого генеза.
2. Проанализировать зависимость изменения активности цистеиновых протеиназ от длительности болезни Альцгеймера.
3. Провести комплексную оценку содержания продуктов карбонилирования белков плазмы, полиморфноядерных и моноядерных

лейкоцитов крови и оценить резервно-адаптационный потенциал при деменции сосудистого генеза и в динамике болезни Альцгеймера.

4. Оценить уровень веществ низкой и средней молекулярной массы в плазме, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови при деменции сосудистого генеза и в динамике болезни Альцгеймера.

5. Проанализировать взаимосвязь состояния карбонилирования белков и лизосомального цистеинового протеолиза при болезни Альцгеймера и деменции сосудистого генеза.

Научная новизна

Впервые исследована активность лизосомальных цистеиновых протеиназ (ЛЦП) полиморфноядерных (пМЯЛ) и моноядерных лейкоцитов (МЯЛ) пациентов с БА, а также пациентов с ДСГ. Было выявлено, что БА ассоциирована с нарастанием активности цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и МЯЛ, а также катепсинов В и Н в пМЯЛ периферической крови. Установлено, что активность катепсина L изменяется в динамике БА в МЯЛ и пМЯЛ. Активность катепсина L в плазме крови пациентов с ДСГ выше, чем в группе сравнения и у пациентов с БА. Также течение ДСГ сопровождается повышением активности катепсина В в обеих изучаемых фракциях лейкоцитов и активности катепсина L в пМЯЛ. Отрицательная обратная связь средней силы была выявлена между уровнем ОМБ и активностью катепсина Н пМЯЛ и МЯЛ у пациентов с БА.

В ходе исследования впервые определено содержание карбонильных производных модифицированных белков во ФЛ при БА и ДСГ. Обнаружено достоверное повышение уровня карбонильных производных в МЯЛ при БА, а также истощение РАП этих клеток. В этой же фракции лейкоцитов обнаружено статистически достоверное повышение уровня ВНиСММ при БА.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование носит преимущественно фундаментальный характер. Представленные в работе экспериментальные данные позволяют оценить метаболические изменения лейкоцитов периферической крови при БА и ДСГ

(состояние активности ЛЦП, уровень ОМБ, степень выраженности синдрома ЭИ), что может быть учтено при разработке полимодальных диагностических панелей для прижизненной диагностики и мониторинга течения БА и ДСГ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Активность цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и моноядерных лейкоцитах, а также катепсинов В и Н в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови пациентов с болезнью Альцгеймера повышена по сравнению с аналогичными показателями у пациентов, не имеющих признаков нейродегенерации.

2. Активность катепсина L полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера изменяется в зависимости от длительности течения заболевания: у пациентов с длительностью заболевания 3-5 лет показатель выше, чем у пациентов с начальной (1-3 года) и поздней (5-10 лет) стадиями.

3. Суммарный уровень продуктов карбонилирования белков моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера превышает аналогичный показатель в группе сравнения; резервно-адаптационный потенциал плазмы крови, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов пациентов с БА существенно снижен, причем с течением заболевания в большей степени истощается резервно-адаптационный потенциал плазмы.

4. Уровень веществ низкой и средней молекулярной массы моноядерных лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера превышает аналогичный в группе сравнения, при этом в большей степени он повышен на ранних стадиях заболевания.

5. Между уровнем карбонильных производных модифицированных белков и активностью катепсина Н в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах при болезни Альцгеймера существует отрицательная обратная связь средней силы.

6. При деменции сосудистого генеза активность катепсина L в плазме крови и полиморфноядерных лейкоцитах, а также активность катепсина В в

полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови выше, чем у пациентов, не имеющих признаков деменции и нейродегенерации.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты доложены на конференциях: 1) Всероссийская научно-практическая конференция с Международным участием «Память, память будущего и сценарии жизни» 14-17 июня 2018, г. Рязань. 2) 11 Международная научно-практическая конференция «Достижения фундаментальных наук-основа формирования современной медицины» г. Астрахань, 12-14 сентября 2018. 3) 25 Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины -2019» г. Санкт-Петербург, 28-29 марта 2019. 4) XVII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета 10 октября 2019 года, г. Челябинск. 5) Ежегодная научная конференция Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. 20 декабря 2019 года, г. Рязань. 6) XXVI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблем биомедицины – 2020», 26-27 марта 2020.

Личный вклад автора

Проведение информационного поиска по изучаемой проблеме, анализ источников литературы, проведение всех этапов лабораторных исследований, оформление первичной документации и статистическая обработка результатов выполнены лично автором или при его непосредственном участии. Разработка модели научного исследования, формулировка цели и задач, анализ, систематизация, статистическая обработка и представление основных результатов работы в научных публикациях проводились совместно с научным руководителем и научным консультантом.

Сведения о внедрении

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу кафедр

биологической химии с курсом КЛД ФДПО, психиатрии и психотерапии ФДПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в практику Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая психиатрическая больница имени Н.Н. Баженова».

Объем и содержание работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Текст работы изложен на 135 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, проиллюстрирован 47 рисунками. Список литературы включает 261 источник: 67 отечественных и 194 зарубежных.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 работы в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, 1 из которых в издании, входящем в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Базой исследования стала кафедра биологической химии с курсом КЛД ФДПО РязГМУ. Материалом для исследования явились плазма крови и лейкоциты (пМЯЛ и МЯЛ) периферической крови пациентов. Группу наблюдения №1 составили 25 пациентов ГБУ РО «Областная клиническая психиатрическая больница имени Н.Н. Баженова», имеющие диагноз «Болезнь Альцгеймера», установленный по современным критериям. В группу наблюдения №2 вошли 25 пациентов того же стационара с диагнозом «Деменция сосудистого генеза», не имеющие признаков НД. От пациентов с БА этих больных отличает, главным образом, скорость начала заболевания: острое, после перенесенной сосудистой катастрофы при ДСГ, и длительное,

постепенное при БА. У пациентов группы наблюдения №1 также имеются признаки цереброваскулярной болезни, однако помимо этого наличие НД подтверждено результатами МРТ. В группу сравнения вошли 25 пациентов, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами группы наблюдения №1, находящиеся на стационарном лечении в ГБУ РО «ОКПБ имени Н.Н. Баженова», с диагнозом «Расстройства приспособительных реакций» (F 43.2 по МКБ-10). У этих пациентов наблюдалось состояние субъективного дистресса и эмоционального расстройства, создающее трудности для общественной деятельности и поступков, возникающее в период адаптации к значительному изменению в жизни или стрессовому событию. Пациенты были осмотрены неврологом, терапевтом, психиатром. Признаков деменции больные не имели. Включение пациентов в группы осуществлялось после их добровольного информированного согласия. Критериями исключения для пациентов всех групп стали заболевания, для которых на сегодняшний день установлено увеличение активности ЛЦП, а также нарастание уровня ОС: онкологические и ревматоидные заболевания, патологии почек, сахарный диабет, гепатиты. Включение пациентов в исследование согласовано решением локального этического комитета РязГМУ, протокол №6 от 06.11.2018.

Для изучения изменений показателей в динамике БА пациенты группы наблюдения №1 были разделены на три группы в зависимости от длительности течения заболевания: 1) 1-3 года (n=8), 2) 3-5 лет (n=8), 3) 5-10 лет (n=9). Пациенты группы №1 также были разделены на 2 подгруппы в зависимости от тяжести деменции, определенной по шкале оценки психического статуса MMSE (Mini Mental State Examination) (Folstein M.F. et al., 1975). Среди пациентов группы наблюдения №1 12 имели деменцию умеренной степени (УД) (оценка MMSE $14 \pm 1,8$), 13 – тяжелую деменцию (ТД) (MMSE= $6 \pm 2,1$).

Фракционирование лейкоцитов производилось методом изопикнического центрифугирования. Подсчет лейкоцитов осуществлялся в камере Горяева с помощью бинокулярного микроскопа Р-15 «Биолам». Активность катепсинов В, L и Н изучалась спектрофлуориметрическим методом по Barrett и Kirschke.

Измерение содержания продуктов карбонилирования белков проводилось по методу R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой. Комплексная оценка содержания продуктов карбонилирования белков осуществлялась на основе авторской методики, разработанной на кафедре биологической химии РязГМУ (Пат. 2524667 РФ, МПК G01N 33/52). Резервно-адаптационный потенциал (РАП) оценивался расчетным способом по методу Никитиной Ю.В. Определение концентрации ВНиСММ проводилось по методике Копытовой Т.В. Показатели рассчитывались на миллиграмм белка (в плазме крови измерение концентрации белка осуществлялось биуретовым методом с использованием коммерческих наборов производства «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург, в гомогенатах клеток – по методу Лоури с помощью набора «Клини Тест-БЛ» «Эко Сервис», Россия).

Полученные в исследовании результаты обрабатывались статистически согласно руководству по медицинской статистике с помощью современных программных пакетов математико-статистического анализа: «Microsoft Excel 2016» и «Statistica 10.0», работающие в операционной среде «Windows». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для описания количественных признаков в выборках рассчитывались показатели медианы (Me), минимальное (min) и максимальное (max) значения. Статистическая достоверность различий количественных признаков между двумя группами оценивались по непараметрическому критерию Манна-Уитни (U-тест). Корреляционный анализ проводился с помощью программы «Statistica 10.0» с определением коэффициента Спирмена (r). Отличия принимались за статистически значимые при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение активности катепсинов

В плазме крови пациентов с БА активность катепсинов В, L, Н статистически значимо повышена по сравнению с пациентами, не имеющими признаков НД (группа сравнения) ($p=0,04$; $p=0,03$; $p=0,05$ соответственно).

Наиболее существенна степень повышения активности катепсина L (в 4 раза), в то время как активность катепсина В повышена в 2,5 раза, а катепсина Н – в 1,4 раза (рис. 1). Активность катепсина В в плазме крови пациентов с БА превышает соответствующий показатель в группе сравнения и в группе пациентов с ДСГ (в 1,4 раза).

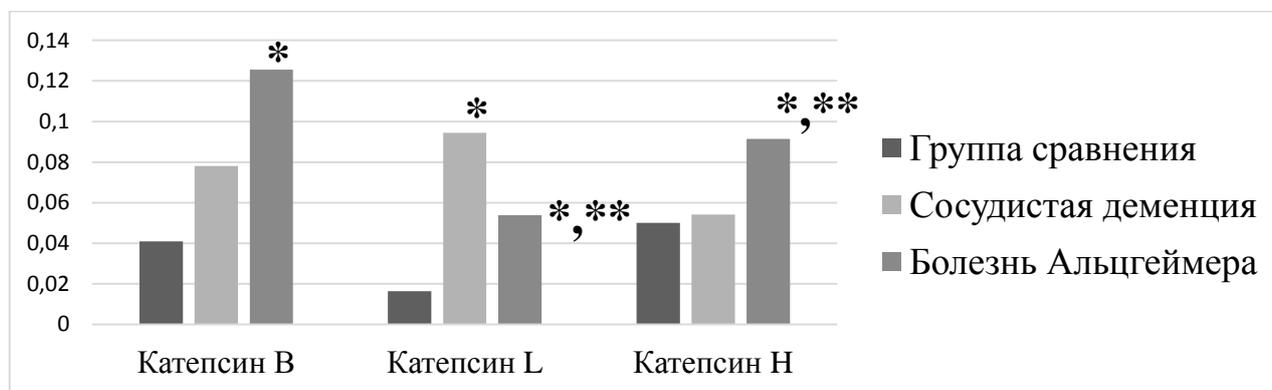


Рисунок 1 - Активность цистеиновых катепсинов в плазме крови (нкат/мл)

Примечание: для рисунков 1-3 * - статистически достоверное отличие групп наблюдения (БА и ДСГ) от группы сравнения;

** - статистически достоверное отличие группы ДСГ от группы БА

Это доказывает существенный вклад фермента в патогенез НДЗ, возможность использовать его в качестве биомаркера в проспективных исследованиях (Morena F. et al., 2017; Cheng Z. et al., 2018). Повышение активности катепсина В в плазме крови при БА можно объяснить его способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, а также активным участием фермента в метаболизме APP (Mueller-Steiner S. et al., 2006; Stoka V. et al., 2016). Активность катепсина L в плазме крови пациентов с ДСГ повышена как относительно группы сравнения, так и относительно группы пациентов с БА (в 7 и 1,75 раз соответственно). ДСГ, вероятно, сопровождается более значительным изменением компартментализации этого фермента, выходом из лизосом в межклеточное пространство и повышением его активности в крови.

В пМЯЛ пациентов с БА выявлено следующее: активность катепсинов В и Н повышена в 19,6 ($p=0,01$) и 10 раз соответственно ($p=0,04$) относительно группы сравнения, активность катепсина L - в 1,2 раза (рис. 2). В пМЯЛ пациентов с ДСГ активность всех трех катепсинов выше, чем у группы

сравнения (статистически достоверно для катепсина В, $p=0,047$, и катепсина Н, $p=0,05$). Однако активность катепсина L в пМЯЛ данных больных несколько выше, чем у пациентов с БА (рис. 2). В МЯЛ пациентов с БА отмечаются следующие изменения: выражено нарастание активности катепсина В – повышение в 5 раз относительно группы сравнения ($p=0,01$), в 4,7 раз повышена активность катепсина L ($p=0,03$), и в 3 раза катепсина Н ($p=0,05$) (рис. 3).

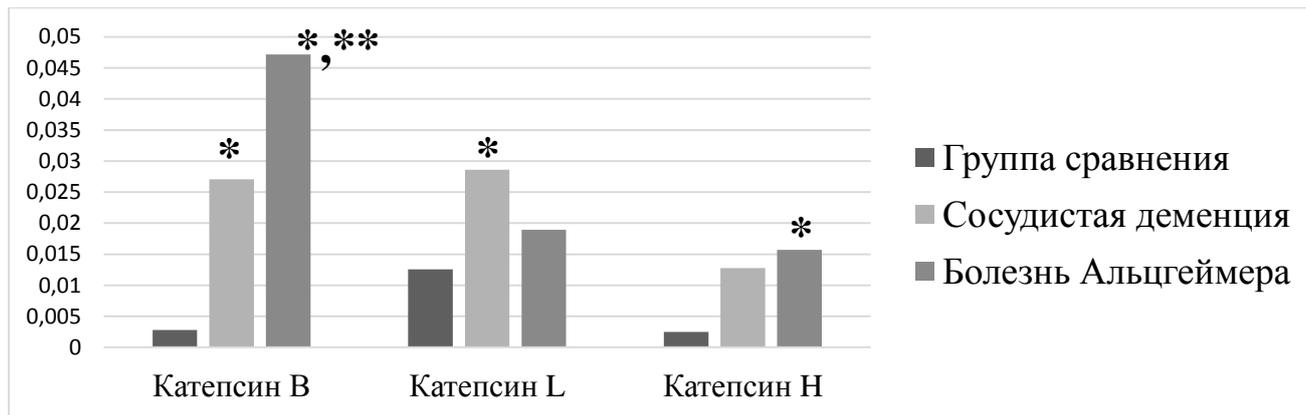


Рисунок 2 - Активность цистеиновых катепсинов в пМЯЛ (нкат/млн клеток)

Полученные результаты позволяют предположить вовлеченность ЛЦП лейкоцитов в НД. Во ФЛ наблюдается однонаправленная тенденция: преимущественное повышение активности катепсинов В и Н на фоне незначительного повышения активности катепсина L.

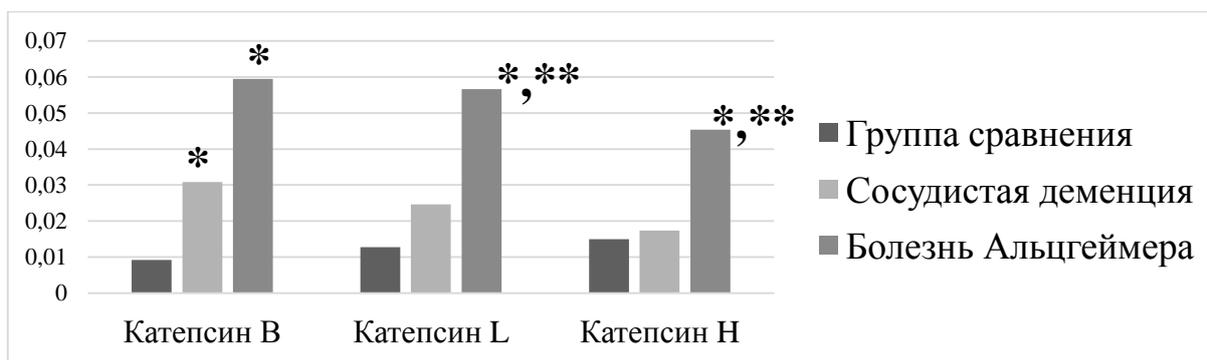


Рисунок 3 - Активность цистеиновых катепсинов в МЯЛ (нкат/млн клеток)

Разрушение лизосомальных мембран пМЯЛ и выход катепсинов В и Н в цитоплазму можно считать патогенетически значимым фактором при БА и развитии НД.

2. Динамика изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ с течением болезни Альцгеймера

Активность ЛЦП плазмы крови с течением БА изменяется не существенно. Во ФЛ при БА с течением заболевания (группа 3-5 лет) первоначально нарастает активность катепсина L (в пМЯЛ в 2,15 раз, в МЯЛ – в 2,6 раз) по сравнению с группой 1-3 года, а затем снижается (в 1,5 раза в пМЯЛ, в 1,6 раз в МЯЛ) в группе с длительностью БА 5-10 лет (рис. 4, 5).

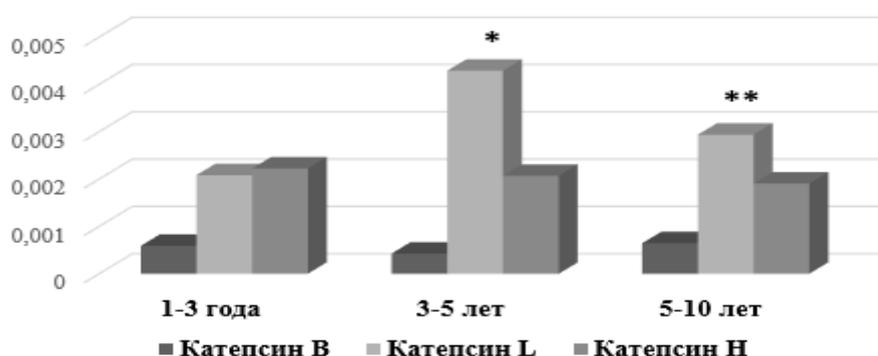


Рисунок 4 - Изменение активности катепсинов в пМЯЛ в динамике БА

Примечание: для рисунков 4-5 * - статистически достоверное отличие группы 3-5 лет от группы 1-3 года, $p < 0,05$;

** - статистически достоверное отличие группы 5-10 лет от группы 3-5 лет, $p < 0,05$

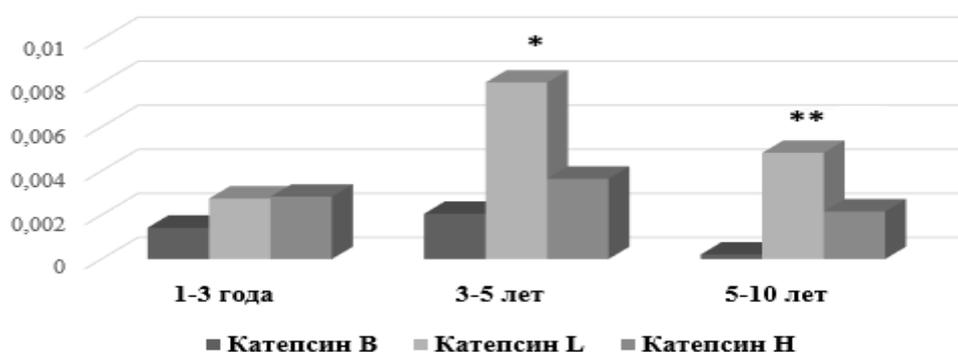


Рисунок 5 - Изменение активности катепсинов в МЯЛ в динамике БА

Повышение активности катепсина L в лейкоцитах пациентов с БА может быть связано с адапционными механизмами, протекающими в ЦНС. Катепсин L, как протеаза, участвующая в процессинге нейропротекторных пептидов, адаптивно повышает свою активность. Однако с течением

заболевания резервно-адаптационные механизмы организма исчерпываются, а сам фермент может подвергаться окислению наряду с другими белками (Zheng H. et al., 2006).

Как длительность заболевания достоверно не сказывается на изменении активности катепсинов плазмы при БА, так и степень выраженности деменции не влияет на изучаемый показатель. Для пМЯЛ выявлена следующая закономерность: у пациентов с ТД активность катепсина L в 2,1 раза выше ($p < 0,05$), чем у пациентов с УД (рис. 6). В МЯЛ напротив – у группы с ТД активность катепсина L в 1,5 раза ниже ($p < 0,05$), чем при УД.

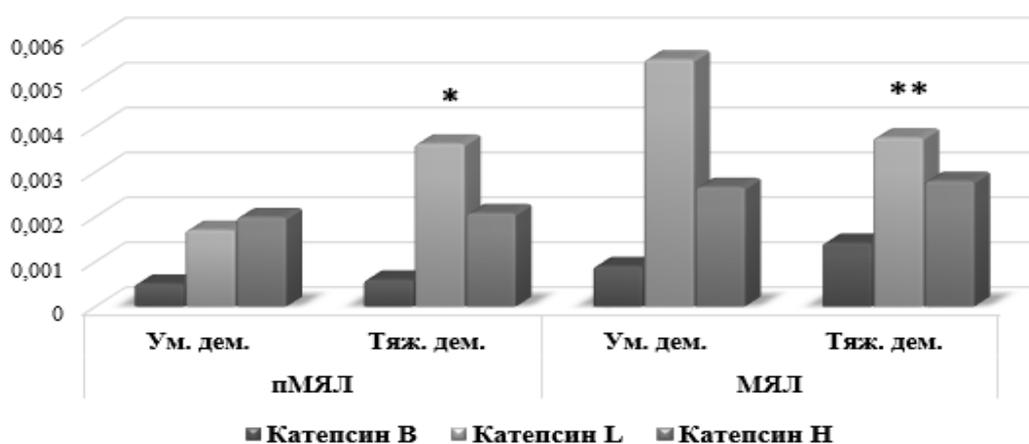


Рисунок 6 – Активность катепсинов в фракционированных лейкоцитах пациентов с умеренной и тяжелой деменцией, вызванной БА

* - статистически достоверное отличие активности катепсина L в пМЯЛ (** - МЯЛ) группы с тяжелой деменцией по отношению к группе с умеренной деменцией, $p < 0,05$

3. Определение уровня окислительной модификации белков

ОС наблюдается как в группах наблюдения (БА и ДСГ), так и в группе сравнения. Суммарное количество продуктов спонтанной ОМБ (ОМБсп) в плазме крови статистически не отличается в группах: 0,133у.е./г белка у пациентов с БА, 0,148у.е./г белка – в группе ДСГ, 0,214у.е./г – в группе сравнения. Определение уровня индуцированной ОМБ (ОМБинд) плазмы показало, что у пациентов с БА существенно повышается общий уровень продуктов карбонилирования белков (0,901у.е./г белка у пациентов с БА, 0,269у.е./г белка в группе сравнения, $p < 0,05$). Растет количество кето-, и

альдегидных производных, происходит активный переход первичных маркеров во вторичные (прямой механизм ОС). Это указывает на истощение резервных сил организма, низкую способность противостоять реакциям свободно-радикального окисления. Индуцированное окисление не вызвало существенного повышения карбонильных производных в плазме крови пациентов с ДСГ и группы сравнения.

Достоверных различий в уровне производных ОМБсп и ОМБинд в пМЯЛ крови пациентов с БА, ДСГ и группы сравнения получено не было. При измерении ОМБсп в МЯЛ обнаружено повышение общего уровня карбонильных производных в группе БА по сравнению с ДСГ и группой сравнения, в основном за счет увеличения АДНФГ нейтрального характера: 16,98 у.е./г белка в группе сравнения, 17,31 у.е./г белка в группе ДСГ, 22,14 у.е./г белка у пациентов группы БА ($p < 0,05$). Статистически достоверно повышен и суммарный уровень ОМБинд в группе БА 37,43 у.е./г белка по отношению к группе сравнения (19,79 у.е./г белка), $p < 0,01$.

Оценка доли ОМБсп в ОМБинд в плазме крови при БА показала существенное снижение РАП (таб.1).

Таблица 1 – Доля АДНФГ и КДНФГ спонтанной ОМБ в АДНФГ и КДНФГ индуцированной ОМБ (%)

		АДНФГ		КДНФГ	
		нейтрального характера	основного характера	нейтрального характера	основного характера
Плаз -ма	БА	14,6**	39,2	46,7	29,7*
	ДСГ	45,3	18,7**	34,3	13,3**
	Гр. срав.	97,5	38,5	55,9	45,9
МЯЛ	БА	83,2	53,1*	59,4*	47,1*
	ДСГ	82,2	54,1*	78,6	67,8
	Гр. срав.	90,7	84,7	91,6	86,2
МЯЛ	БА	61,8*	59,6*	54,6*	75,1
	ДСГ	90,7	70,6	76,0	79,8
	Гр. срав.	83,8	82,1	83,7	80,0

Примечание: *- статистически достоверное отличие групп наблюдения (БА, ДСГ) по отношению к группе сравнения, $p < 0,05$; **- $p < 0,01$.

Полученные результаты можно расценивать как существенное истощение резервных возможностей антиоксидантных систем плазмы крови пациентов с

БА. Сходная картина прослеживается и у пациентов с ДСГ: РАП плазмы крови снижен, что указывает на значительную выраженность ОС и истощение антиоксидантных систем.

Оценка РАП пМЯЛ при БА и ДСГ также свидетельствует об истощении резервов физиологической защиты клеток от свободных радикалов, так как существенно возрастает доля АДНФГ основного характера (при БА и ДСГ) и КДНФГ как нейтрального, так и основного характера при БА (таб. 1).

4. Оценка уровня окислительной модификации белков в динамике болезни Альцгеймера

У пациентов с длительным течением заболевания (5-10 лет) суммарный уровень ОМБ плазмы превышает таковой в группе с длительностью БА 1-3 года ($p < 0,05$) в основном за счет альдегидных и кетонных производных нейтрального характера (рис. 7). С течением БА существенно снижается РАП плазмы крови (рис. 8). У пациентов с длительным течением БА (5-10 лет) РАП в 4 раза ниже, чем у пациентов с начальной стадией БА (1-3 года) (46,7% и 11,4% соответственно, $p = 0,002$).

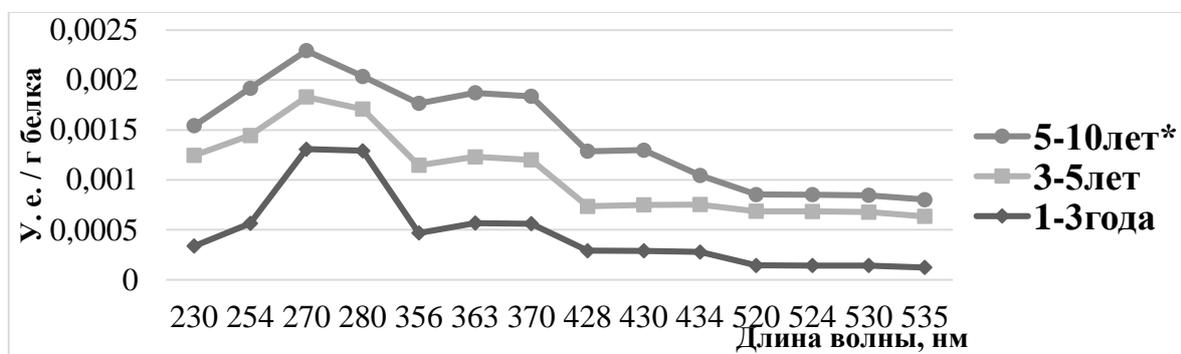


Рисунок 7 - Зависимость степени выраженности уровня ОМБ плазмы крови от длительности течения БА

* - статистически достоверное отличие уровня ОМБ группы 5-10 лет по отношению к группе 1-3 года, $p < 0,05$

РАП пМЯЛ не имеет достоверных отличий в группах с различной длительностью течения БА. Это может быть связано с непродолжительным сроком жизни гранулоцитарных лейкоцитов (4-5 часов в периферической крови, 4-5 суток в тканях), а также особым статусом прооксидантных процессов: генерация АФК является одним из механизмов проявления

защитного действия этих лейкоцитов в отношении разрушения фагоцитированных частиц и микробных клеток. Продолжительность существования МЯЛ несколько выше – от нескольких месяцев до нескольких лет. Динамика изменения РАП в МЯЛ не имеет статистической достоверности, однако наблюдается следующая тенденция: у пациентов с длительностью течения БА 5-10 лет РАП МЯЛ в 1,5 раза ниже, чем у пациентов с начальной стадией (60,9% и 43,0% соответственно). Способность клеток противостоять ОС уменьшается с течением заболевания.

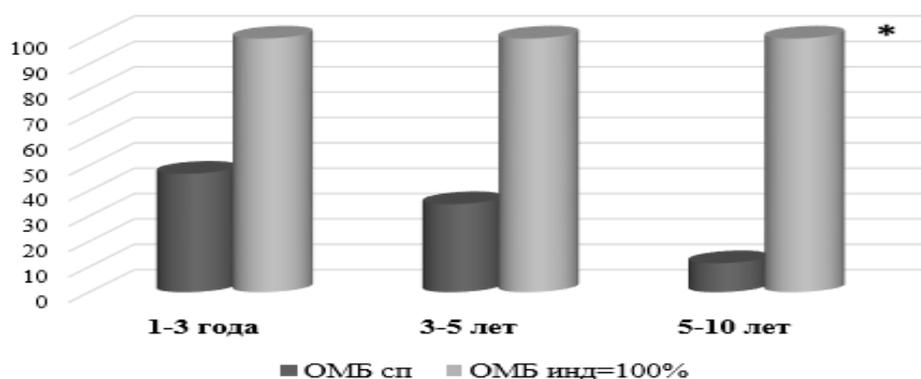


Рисунок 8 – Динамика изменения РАП плазмы крови с течением БА
 * - статистически достоверное отличие по отношению к группе 1-3 года,
 $p=0,002$

Уровень карбонильных производных в плазме крови при УД и ТД статистически не отличается, однако у пациентов с более выраженными дементными нарушениями отмечается большее нарастание ОМБинд (0,02 у.е./г белка при УД и 0,03 у.е./г белка при ТД). В пМЯЛ при ТД уровень ОМБсп всего на 13% выше, чем при УД. Также не существенно отличается нарастание уровней ОМБинд в этой фракции лейкоцитов в зависимости от тяжести деменции. А в МЯЛ пациентов с ТД уровень ОМБсп на 26% выше, чем при УД.

При оценке РАП плазмы и ФЛ крови при БА в зависимости от тяжести деменции обнаружено: более выражено истощение РАП плазмы и МЯЛ, в то время как РАП пМЯЛ практически не отличается у больных с ТД и УД. Таким образом, развитие ОС с течением БА сказывается на увеличении доли карбонильных производных белков плазмы крови и МЯЛ.

5. Взаимосвязь уровня окислительной модификации белков и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ при болезни Альцгеймера
В пМЯЛ при БА (таб. 2) обнаружена отрицательная взаимосвязь между

Таблица 2 - Взаимосвязь уровня ОМБ и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ (Коэффициент Спирмена, r)

Активность лизосомальной протеиназы	Группа	Площадь под кривой спектра поглощения продуктов ОМБ				
		S _{АДНФн}	S _{АДНФo}	S _{КДНФн}	S _{КДНФo}	S _{общ}
Плазма						
Катепсин В	БА	0,37	-0,09	-0,09	-0,11	0,20
	ДСГ	0,18	0,20	-0,07	-0,19	0,16
	Гр. сравн.	0,32	-0,25	-0,03	-0,16	0,21
Катепсин L	БА	0,31	-0,04	-0,12	-0,01	0,29
	ДСГ	0,27	0,19	0,38	-0,01	0,30
	Гр. сравн.	0,51**	0,29	0,47*	-0,01	0,46*
Катепсин Н	БА	0,28	-0,31	-0,38	-0,28	0,06
	ДСГ	0,14	-0,15	0,17	-0,18	0,19
	Гр. сравн.	0,06	-0,10	0,10	-0,28	-0,09
пМЯЛ						
Катепсин В	БА	-0,30	-0,22	-0,17	-0,25	-0,30
	ДСГ	-0,39*	-0,25	-0,27	-0,28	-0,41*
	Гр. сравн.	-0,54**	-0,45*	-0,48*	-0,48*	-0,54**
Катепсин L	БА	0,04	0,05	0,02	0,06	-0,09
	ДСГ	-0,23	-0,39*	-0,14	-0,39*	-0,32
	Гр. сравн.	-0,33	-0,43*	-0,43*	-0,49*	-0,33
Катепсин Н	БА	-0,58**	-0,18	-0,45*	-0,24	-0,46*
	ДСГ	-0,10	-0,02	-0,07	-0,09	-0,16
	Гр. сравн.	-0,20	-0,12	-0,20	-0,01	-0,20
МЯЛ						
Катепсин В	БА	-0,13	0,24	0,03	-0,12	0,04
	ДСГ	0,24	0,12	0,14	0,16	0,16
	Гр. сравн.	0,15	0,32	0,34	0,37	0,26
Катепсин L	БА	0,04	0,33	0,20	0,19	0,10
	ДСГ	0,09	0,25	0,29	0,30	0,15
	Гр. сравн.	-0,09	0,37	-0,19	0,33	0,05
Катепсин Н	БА	-0,40*	-0,15	-0,33	-0,10	-0,28
	ДСГ	0,06	0,21	-0,17	-0,19	-0,13
	Гр. сравн.	-0,26	0,28	-0,37	-0,37	-0,15

Примечание: * - p<0.5, ** - p<0.01

активностью катепсина Н и уровнем первичных (САДНФГн) и вторичных (СКДНФГн) маркеров окислительного повреждения белков ($r=-0.58$, $p<0.01$ и $r=-0.45$, $p<0.05$ соответственно) клеток крови, а также общим уровнем ОМБ ($r=-0.45$, $p<0.05$). В МЯЛ пациентов в БА также выявлена отрицательная корреляция между уровнем $S_{\text{АДНФГн}}$ и активностью катепсина Н ($r=-0.40$, $p<0.05$) (таб. 2). Выявленная отрицательная корреляция свидетельствует о вовлечении данной протеиназы в деградацию продуктов, накопленных в результате активации ОС. У пациентов группы сравнения была выявлена прямо пропорциональная связь между активностью катепсина L плазмы крови и уровнем альдегидных и кетонных производных ОМБ нейтрального характера ($r=0.51$, $p<0.01$ для АДНФГн, $r=0.47$, $p<0.05$ для КДНФГн), а также общим уровнем ОМБ ($r=0.46$, $p<0.05$) (таб. 2). В пМЯЛ пациентов без НД отмечается отрицательная корреляция между активностью катепсинов В и L и уровнем ОМБ. Выявленная зависимость может быть связана с тем, что сам фермент подвергается окислительной модификации.

В группе пациентов с ДСГ в пМЯЛ отмечается схожая с группой сравнения тенденция: чем выше активность катепсина В, тем ниже уровень АДНФГн ($r=-0.39$, $p<0.05$) и суммарный уровень ОМБ ($r=-0.41$, $p<0.05$); чем выше активность катепсина L, тем ниже уровень альдегидных и кетонных дериватов основного характера ($r=-0.39$, $p<0.05$). Выявленная закономерность свидетельствует о существенном вкладе катепсинов В и L в деградацию и утилизацию продуктов ОМБ в пМЯЛ. У пациентов же с БА, вероятно, протективное действие данных протеаз снижено за счет окислительной модификации самих белковых молекул энзимов.

6. Оценка степени выраженности эндогенной интоксикации

Уровень ВНиСММ в МЯЛ для обеих групп наблюдения оказался статистически значимо выше аналогичного показателя в группе сравнения (таб. 3, рис. 9). У пациентов с ДСГ этот показатель вдвое выше, чем у пациентов группы сравнения, в то время как при БА отмечается увеличение концентрации ВНиСММ в МЯЛ в 10,8 раз ($p<0.05$).

Таблица 3 - Суммарный уровень веществ низкой и средней молекулярной массы (усл.ед.)

	Болезнь Альцгеймера	Сосудистая деменция	Группа сравнения
Плазма крови	155,70	152,27	143,56
МЯЛ	15,43**	2,82*	1,42
пМЯЛ	5,33	3,85	4,16

Пик поглощения ВНиСММ в МЯЛ при БА приходится на 250нм, что соответствует накоплению гипоксантина, инозина, ксантозина и их производных (Карпищенко А.И., 2013). Повышение накопления этих продуктов может быть следствием окислительной модификации нуклеиновых кислот в изучаемых клетках (Щерина А.В. и др., 2018; Singh A. et al., 2019).

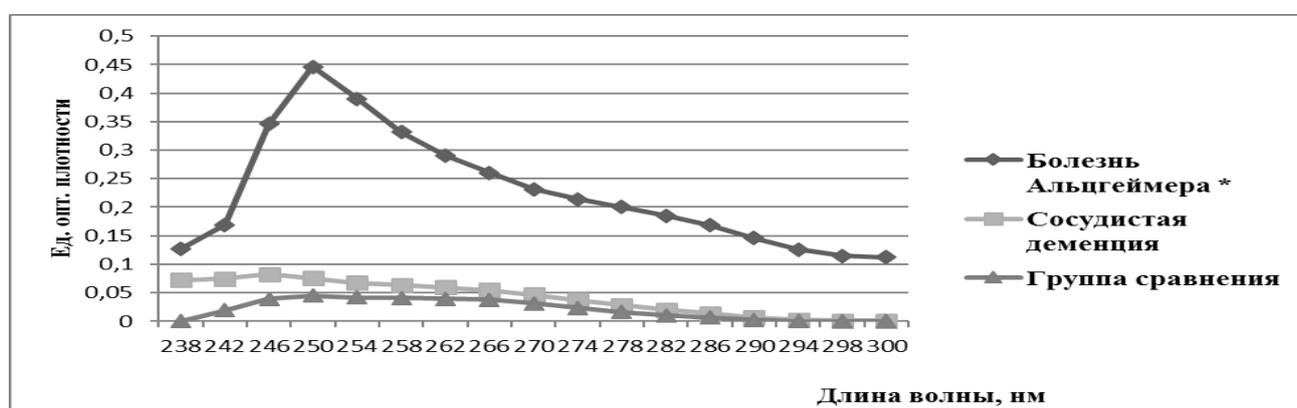


Рисунок 9 – Спектры поглощения ВНиСММ в МЯЛ

* - статистически достоверное отличие группы БА от группы сравнения, $p < 0,05$

Концентрация ВНиСММ в МЯЛ статистически выше у пациентов с длительностью заболевания 1-3 года ($p < 0,05$) (рис. 10). На начальных этапах заболевания происходит значительная активизация ОС, тканевого протеолиза, что приводит к развитию синдрома ЭИ. С течением времени, вероятно, в организме активируются адаптационные детоксикационные системы: монооксигеназная, иммунная, выделительная, - что сказывается на метаболизме МЯЛ, выраженности ЭИ несколько уменьшается (Кротенко Н.М. и др., 2012; Кузнецов П.Л. и др., 2013).

Во ФЛ, полученных от пациентов с БА, уровень ВНиСММ выше у больных с УД (рис. 11). При УД содержание ВНиСММ в пМЯЛ в 3,2 раза выше ($p < 0,01$), чем при ТД. Аналогичная тенденция характерна и для МЯЛ: в 2,3 раза ($p < 0,05$) уровень ВНиСММ выше у больных с УД. ТД наблюдается при длительном течении заболевания (3-5 лет и более), УД чаще встречается на

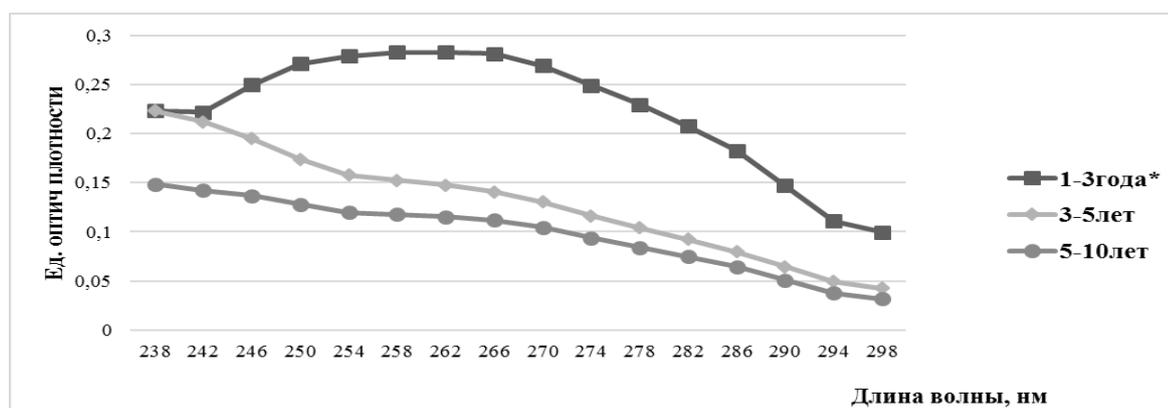


Рисунок 10 – Уровень ВНиСММ в МЯЛ в динамике болезни Альцгеймера

* - статистически достоверное отличие группы 1-3 года по отношению к группе 5-10 лет, $p < 0,05$ начальных этапах БА (1-3 года), реже при больших сроках болезни. Получаемая больными БА в течение долгих лет фармакотерапия, без сомнений, в той или иной степени изменяет метаболические процессы, происходящие в организме.

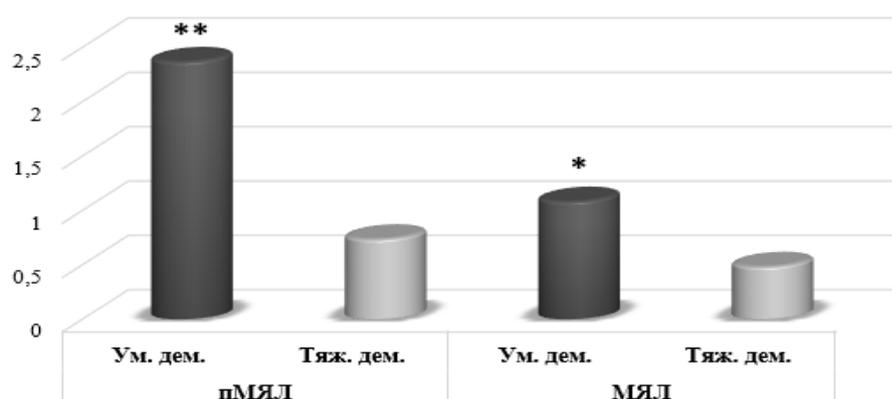


Рисунок 11 – Уровень ВНиСММ в лейкоцитах пациентов с различной степенью деменции, вызванной болезнью Альцгеймера

* - статистически достоверное отличие, $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$

Однако снижение выраженности ЭИ в клетках крови больных с ТД, по сравнению с аналогичным показателем у больных с УД, может быть следствием не только активации адаптационно-приспособительных процессов организма, но и накопления нейропротекторных молекул на фоне длительно проводимой фармакотерапии (Узбеков М.Г. и др., 2018; Узбеков М.Г., 2019).

ВЫВОДЫ

1. Болезнь Альцгеймера сопровождается повышением активности цистеиновых катепсинов В, L, Н в плазме и моноядерных лейкоцитах, а также катепсинов В и Н в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови по

сравнению с пациентами без признаков нейродегенерации; при деменции сосудистого генеза в плазме и полиморфноядерных лейкоцитах повышена активность катепсина L и катепсина B в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах.

2. Активность катепсина L полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов крови при болезни Альцгеймера изменяется в динамике: у пациентов с длительностью заболевания 3-5 лет выше, чем у пациентов с начальной (1-3 года) и поздней (5-10 лет) стадиями.

3. Болезнь Альцгеймера протекает на фоне повышения уровня карбонилированных белков моноядерных лейкоцитов крови; резервно-адаптационный потенциал протеолитических систем плазмы, полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитов крови значительно снижен; в динамике заболевания в большей степени истощается резервно-адаптационный потенциал плазмы; деменция сосудистого генеза сопровождается истощением резервно-адаптационного потенциала плазмы.

4. Болезнь Альцгеймера ассоциирована с развитием эндогенной интоксикации: уровень веществ низкой и средней молекулярной массы моноядерных лейкоцитов крови пациентов с болезнью Альцгеймера превышает аналогичный в группе сравнения, при этом в большей степени он повышен на ранних стадиях заболевания.

5. Выявлена отрицательная обратная связь средней степени между уровнем карбонильных производных модифицированных белков и активностью катепсина H в полиморфноядерных и моноядерных лейкоцитах крови при болезни Альцгеймера, а также активностью катепсинов B и L в полиморфноядерных лейкоцитах у больных с деменцией сосудистого генеза, что свидетельствует об участии соответствующих протеиназ в деградации продуктов, накопленных в результате модификации белков.

6. Активность катепсина L в плазме крови и полиморфноядерных лейкоцитах, а также катепсина B в обеих изучаемых фракциях лейкоцитов

пациентов с деменцией сосудистого генеза выше, чем у пациентов без признаков деменции и нейродегенерации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью диагностики и мониторинга течения БА, определения степени выраженности метаболических отклонений, происходящих в организме пациентов, необходима оценка данных о биохимических изменениях в лейкоцитах, преимущественно моноядерных, с последующей разработкой полимодальных панелей.

2. Определение показателей активности катепсинов, уровня ОМБ, степени выраженности ЭИ для диагностики НДЗ, необходимо осуществлять в комплексе с другими биохимическими маркерами для повышения уровня диагностической специфичности.

3. При дифференциальной диагностике когнитивных нарушений нейродегенеративного и сосудистого генеза целесообразно проведение оценки активности катепсина L в сыворотке крови.

4. Целесообразно проведение лабораторного исследования нарастания или снижения уровня ОМБ, ЭИ лейкоцитов в динамике БА при обосновании назначения сосудистой терапии, а также для оценки эффективности проводимой антиоксидантной терапии.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы, моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитов крови при болезни Альцгеймера / **М.Г. Сорокина**, М.А. Фомина., Д.С. Петров, Н.В. Короткова. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Бюллетень Сибирской медицины**. – 2020. – Т. 19, №3. – С. 83-88.

2. Оценка окислительной модификации белков плазмы крови и лейкоцитов при болезни Альцгеймера / **М.Г. Енгальчева**, М.А. Фомина, Д.С. Петров, Т.В. Тазина. – Текст (визуальный) : непосредственный // **Молекулярная медицина**. – 2020. – Т. 18, №5. – С. 41-45.

3. Взаимосвязь окислительной модификации белков и активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы крови и лейкоцитов при болезни Альцгеймера / **М.Г. Енгальчева**, Н.В. Короткова, Д.С. Петров и др. Текст (визуальный) : непосредственный // **Молекулярная медицина**. – 2020. – Т. 18, №6. – С. 44-51.

Статьи в других изданиях

4. **Сорокина, М.Г.** Болезнь Альцгеймера: проблемы диагностики и перспективы / М.Г. Сорокина, М.А. Фомина., Д.С. Петров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Память, память будущего и сценарии жизни» 14-17 июля 2018. – Рязань, 2018. – С. 118-121.

5. **Сорокина, М.Г.** Современные представления о роли лизосомальных протеиназ в патогенезе болезни Альцгеймера / М.Г. Сорокина, М.А. Фомина., Д.С. Петров. – Текст (визуальный) : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. – Т. 6, №4. – С. 582-588.

6. **Сорокина, М.Г.** Состояние активности лизосомальных протеиназ лейкоцитов крови при болезни Альцгеймера / М.Г. Сорокина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Материалы 25 Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины -2019» г. Санкт-Петербург, 28-29 марта 2019. Санкт-Петербург, 2019. – С.185-187.

7. **Сорокина, М.Г.** Окислительная модификация белков плазмы крови и лейкоцитов пациентов с болезнью Альцгеймера / М.Г. Сорокина, Д.С. Петров, М.А. Фомина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Сборник материалов XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета 10 октября 2019 года, г. Челябинск. – Челябинск, 2019. – С. 110-113.

8. **Енгальчева, М.Г.** Комплексная оценка биохимических маркеров крови при болезни Альцгеймера / М.Г. Енгальчева. - Текст (визуальный) : непосредственный // Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблем биомедицины – 2020», 26-27 марта 2020. – Санкт-Петербург, 2020. – С. 303-305.

9. Оценка выраженности эндогенной интоксикации при болезни Альцгеймера / **М.Г. Енгальчева**, М.А. Фомина, Д.С. Петров и др. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бутлеровские сообщения. – 2020. – Т. 63, №7. – С.119-125.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APP – amyloid precursor protein, белок предшественник амилоида

БА – болезнь Альцгеймера

ВНиСММ – вещества низкой и средней молекулярной массы

ДСГ – деменция сосудистого генеза

ЛЦП – лизосомальные цистеиновые протеиназы

МЯЛ – моноядерные лейкоциты

НД(З) – нейродегенерация, нейродегенеративное заболевание

ОМБ(сп/инд) – окислительная модификация белка (спонтанная/ индуцированная)

ОС – окислительный стресс

пМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты

РАП – резервно-адаптационный потенциал

ТД – тяжелая деменция

УД – умеренная деменция

ФЛ – фракционированные лейкоциты

ЭИ – эндогенная интоксикация