

СОДЕРЖАНИЕ sAPO-1/sFAS В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЭПИЛЕПСИЕЙ И РЕМИТТИРУЮЩЕЙ ФОРМОЙ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Каракулова Ю. В.¹, Соснин Д. Ю.¹, Брохин Л. Ю.², Телегина Е. В.², Желнин А. В.³

¹ ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава (614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 26);

² Пермский региональный эпилептологический центр «Эпицентр» (614066, г. Пермь, ул. Советской Армии, д. 6);

³ ГБУЗ Пермского Края «Ордена Знак Почета Пермская краевая клиническая больница», (614990, г. Пермь, ул. Пушкина, 85); leonid.y.brokhin@yandex.ru

Методом иммуноферментного анализа исследовано содержание маркера апоптоза sAPO-1 (sFas, sCD95) в сыворотке крови пациентов с эпилепсией (n=20), у пациентов с ремиттирующей формой рассеянного склероза (n=18), здоровых взрослых (n=15). Апоптоз – распространенная форма смерти эукариотических клеток, имеющая важное значение в поддержании гомеостаза. APO-1/FAS/CD95 — член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (ФНО, TNF)/фактора роста нервов (NGF). sAPO-1 (sFas, sCD95) представляет собой растворимую форму APO-1, у которой отсутствует трансмембранный участок. Связывание APO-1 с его лигандами приводит к индукции программируемой гибели клеток. Выявлен достоверно более высокий уровень sAPO-1 (sFas) в группе пациентов с эпилепсией по сравнению с группой здоровых (p=0,008) и группой пациентов с рассеянным склерозом (p=0,0007). Не выявлено достоверных различий в группе пациентов с рассеянным склерозом по сравнению с группой здоровых взрослых (p=0,29). Не выявлено статистически значимых достоверных корреляций между полом, возрастом и уровнем sAPO-1 ни в одной из групп.

Ключевые слова: апоптоз, эпилепсия, рассеянный склероз

THE LEVEL OF sAPO-1/sFAS IN SERUM OF PATIENTS WITH EPILEPSY AND RELAPSING-REMITTING FORM OF MULTIPLE SCLEROSIS

Karakulova Y.V.¹, Sosnin D.Y.¹, Brokhin L.Y.², Telegina E.V.², Zhelnin A.V.³

¹ State Educational Establishment of Higher Professional Education «Perm State University of Medicine named after Academician E.A. Vagner» of Ministry of Public Health of Russia, (Petropavlovskaya, 26, 614000 Perm, Russia);

² Perm regional center of epileptology — «Epicenter» (Sovetskoy Armii, 6, 614066, Perm, Russia);

³ Perm Regional Hospital (Pushkina, 85, 614990, Perm, Russia); leonid.y.brokhin@yandex.ru

The study (using enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) examined the levels of marker of apoptosis sAPO-1 (sFas, sCD95) in serum of patients with epilepsy (n=20), patients with relapsing-remitting form of multiple sclerosis (n = 18) and healthy adults (n = 15). Apoptosis — common form of death of eukaryotic cells, which are important in maintaining homeostasis. APO-1/FAS/CD95 receptor is a member of superfamily of the tumor necrosis factor (TNF)/nerve growth factor (NGF). sAPO-1 is a soluble form of APO-1, which lacks the transmembrane region. Binding APO-1 with its ligands leads to the induction of programmed cell death. Significant higher sAPO-1 (sFas) in patients with epilepsy compared to the healthy group (p = 0,008) and the group of patients with multiple sclerosis (p = 0,0007). No significant differences in the group of patients with multiple sclerosis compared to healthy adults (p = 0,29). No statistically significant correlations between gender, age and sAPO-1 in the serum of any of the groups.

Keywords: apoptosis, epilepsy, multiple sclerosis

Программируемая гибель клеток, или апоптоз, представляет собой одну из форм физиологических реакций организма, направленных на элиминацию генетически чужеродных клеток и поддержание гомеостаза [7].

В настоящее время обнаружено более 25 моногенных мутаций, ассоциированных более чем с 18 формами фокальных и генерализованных эпилепсий, а также эпилептических энцефалопатий [2]. Ряд генетически детерминированных болезней обмена приводит к развитию симптоматических форм эпилепсии [3]. Отмечена связь между мезиальным

склерозом, приводящим к развитию эпилепсии (в том числе фармакорезистентной) у взрослых, и фебрильными судорогами в детском возрасте. При этом остается недостаточно ясным вопрос, является ли мезиальный склероз первичной причиной фебрильных судорог и других форм эпилепсии или его развитие является следствием повторных эпилептических пароксизмов и вторично способствует прогрессированию эпилептического процесса [4]. Указанные факты связи генетических нарушений, нейродегенерации и эпилепсии объясняют важность исследования апоптоза для изучения патогенеза идиопатической, криптогенной и симптоматической эпилепсии и эпилептических энцефалопатий.

Апоптоз может быть запущен путем активации поверхностно экспрессируемых «рецепторов смерти», относящихся к надсемейству фактора некроза опухоли (TNF) (внешний путь) или нарушения функции внутриклеточных органелл (внутренний путь). Триггером наружного пути апоптоза является связывание лигандов с одним или более экспрессируемыми на мембране «рецепторами смерти». Лиганды для этих рецепторов включают TNF α , FAS-лиганд и апоптоз-индуцирующий лиганд рецептора TNF (TNF-receptor apoptosis-inducing ligand -TRAIL) [9].

Цель исследования

Сравнить содержание sAPO-1 (sFAS, sCD95) в сыворотке крови пациентов с эпилепсией, здоровых взрослых и пациентов группы сравнения с ремиттирующей формой рассеянного склероза.

Материалы и методы

Обследованы 20 пациентов с эпилепсией, 15 здоровых добровольцев, 18 пациентов группы сравнения с рассеянным склерозом.

У всех пациентов из группы эпилепсии наблюдались генерализованные тонико-клонические эпилептические припадки (изолированные, вероятно, вторично-генерализованные тонико-клонические – 1, простые фокальные + фокальные с нарушением сознания + вторично-генерализованные тонико-клонические – 15, псевдоабсансы + вторично-генерализованные тонико-клонические – 2, фокальные пароксизмы с нарушением сознания и гипермоторными автоматизмами + редкие генерализованные-тонико-клонические - 2). У 12 пациентов была диагностирована криптогенная (вероятно, симптоматическая) эпилепсия, у 8 – симптоматическая эпилепсия (связанная с верифицированной фокальной корковой дисплазией (лобные и/или височные доли) – 6, связанная с мезиальным склерозом – 2). Длительность заболевания составила от 1 года (n = 2) до 20 лет (средняя продолжительность заболевания $12,91 \pm 1,35$ лет). 2 пациента не получали антиэпилептическую терапию (первое обращение к эпилептологу), 18 получали моно- или политерапию антиэпилептическими препаратами на момент исследования: вальпроаты в

монотерапии (n=5), карбамазепин в монотерапии (n=1), карбамазепин + бромдигидрохлорфенилбензодиазепин (n=1), вальпроаты + карбамазепин (n=4), барбитураты + карбамазепин (n=1), барбитураты + карбамазепин + леветирацетам (n=1), вальпроаты + леветирацетам (n=1), зонисамид + леветирацетам (n=2), ламотриджин + карбамазепин (n=2). У 2 пациентов на момент оценки содержания sAPO-1 наблюдалась клинко-электроэнцефалографическая ремиссия >1 года, у 14 на фоне медикаментозной терапии наблюдалось сокращение числа пароксизмов не менее чем на 75% (частота не более 1 раза в 6 месяцев), у 5 отмечалась относительная фармакорезистентность (нерациональная фармакотерапия, нарушение комплаентности) со снижением частоты пароксизмов менее чем на 25% (ежедневные пароксизмы – 2 пациента, до 1 раза в неделю – 2 пациента). Длительность нахождения на указанной антиэпилептической терапии к моменту начала исследования – не менее 3 месяцев.

К группе здоровых относились взрослые без пароксизмальных состояний в анамнезе (с утратой или без утраты сознания) и без клинических признаков серьезных текущих заболеваний ЦНС или неврологического дефицита, без клинически значимых патологических отклонений по данным общего анализа крови и мочи, общетерапевтического биохимического анализа крови, без тяжелых соматических заболеваний, признаков острых инфекционных заболеваний. 3 взрослым из группы здоровых проводилось рутинное ЭЭГ-исследование (у всех был выявлен вариант нормальной ЭЭГ), 2 – магнитно-резонансная томография головного мозга по стандартному протоколу на аппарате 1,5 Тесла в режимах T1, T2, FLAIR, DWI (очаговые изменения вещества мозга выявлены не были), 2 – компьютерная томография головного мозга, 8 человек – исследование на АТ к ВИЧ, реакция микропреципитации на сифилис, вирусные гепатиты В и С (в связи с диспансеризацией, профессиональным отбором и иным – патологии выявлено не было).

В группе сравнения диагноз рассеянного склероза считался достоверным при соответствии его международным критериям McDonald, оценке неврологического статуса, данных МРТ головного и спинного мозга. Магнитно-резонансная томография проводилась на высокопольном МР-томографе с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл в соответствии с общепринятым протоколом. Тяжесть клинического состояния оценивалась по системе Kurtzke, включающей оценку по шкале функциональных систем, и по расширенной шкале инвалидизации (EDSS). Длительность болезни колебалась от 0,1 года до 32 лет, в среднем $12 \pm 2,98$ лет. Суммарный балл инвалидизации по шкале EDSS составил $4,46 \pm 1,56$. Заболевание расценено как легкое у 7 больных, средней тяжести — у 9, тяжелое — у 2. Умеренная скорость прогрессирования отмечалась у 17 пациентов, медленная – у 1 пациента. Пациенты на момент определения sAPO-1 не получали терапию (n=11) или получали

препараты интерферона бета2а (n=7).

Средний возраст пациентов в группе эпилепсии составил $32,05 \pm 3,22$, в группе сравнения $34,56 \pm 1,79$, в контрольной группе $32,4 \pm 2,27$. Распределение по полу: в группе эпилепсии 14 мужчин и 6 женщин, в группе сравнения – 12 мужчин и 5 женщин, в контрольной группе 10 мужчин и 5 женщин.

Статистически значимых различий по возрасту и полу между группами не выявлено.

Количественное определение sAPO-1 проводилось в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для исследования использовался иммуноферментный набор для количественного определения sAPO-1/FAS «Human sAPO-1/Fas Platinum ELISA (BMS245) производства Bender MedSystems GmbH (eBioscience), Vienna, Austria.

С целью подтверждения диагноза и уточнения этиологии и формы заболевания всем пациентам с эпилепсией проводилась электроэнцефалография (рутинная электроэнцефалография – всем пациентам, продленный ЭЭГ-видеомониторинг физиологического сна (от 2 до 10 ч) – 5 пациентам), 15 пациентам проводилась магнитно-резонансная томография (по стандартному протоколу на аппарате 1,5 Тесла в режимах T1, T2, FLAIR – 15, по протоколу высокоточного исследования при эпилепсии – 8, магнитно-резонансная спектроскопия — 1, магнитно-резонансная ангиография артерий головного мозга – 3, магнитно-резонансная венография – 2, перфузионная магнитно-резонансная томография — 1), 4 пациентам проводился лекарственный мониторинг (вальпроевая кислота и карбамазепин).

Статистическая обработка производилась с использованием программных пакетов StatSoft STATISTICA 10, Microsoft Excell 2016 (из набора Microsoft Office 2016 Professional Plus). Для оценки значимости различий между группами использовался двусторонний t-критерий Стьюдента для несвязанных выборок с равным распределением. Равенство дисперсий оценивалось с использованием критерия Фишера. Аномальные значения в выборках оценивались методом вычисления максимального относительного отклонения – в группе пациентов с эпилепсией и группе здоровых добровольцев аномальные значения обнаружены не были, в группе пациентов с рассеянным склерозом из выборки было исключено одно аномальное значение. Поиск корреляций уровня sAPO-1 с возрастом проводился с использованием коэффициента Пирсона. Коэффициент вариации между значениями внутри каждой группы не превышал 33% (т.е. совокупности являются однородными) и значимо не различался между группами.

Результаты и обсуждение

Исследовано содержание маркера апоптоза sAPO-1 (sFas, sCD-95) в сыворотке крови пациентов с эпилепсией (n=20), у пациентов с ремиттирующей формой рассеянного склероза

(n=18), здоровых взрослых (n=15). Среднее содержание sAPO-1 в сыворотке крови пациентов с эпилепсией составило $426,9 \pm 29,8$, что существенно отличается от группы здоровых лиц ($310,16 \pm 26,7$, $p=0,008$) и группы сравнения ($p=0,0007$). У больных с рассеянным склерозом среднее количественное содержание sAPO-1 в сыворотке крови было $289,6 \pm 20,8$ и не имело достоверных отличий в сравнении с группой относительно здоровых лиц.

Таким образом, выявлен достоверно более высокий уровень sAPO-1 в группе пациентов с эпилепсией по сравнению с группой здоровых ($p=0,008$) и группой пациентов с рассеянным склерозом ($p=0,0007$). Достоверных корреляций между полом, возрастом и уровнем sAPO-1/Fas при исследовании в каждой группе отдельно и среди всех пациентов, включенных в данное исследование, не наблюдалось.

Данные о корреляциях sAPO-1 (sFAS, sCD95) с полом и возрастом у здоровых лиц противоречивы [5, 6], что требует дальнейших исследований на больших выборках в широком возрастном диапазоне при тщательном исключении заболеваний, способных вызвать изменение уровня sFAS (данные заболевания, например рак толстой кишки, рассеянный склероз, новообразования матки, молочных желёз, щитовидной железы, имеют широкую распространенность, для некоторых из них частота выявления коррелирует с уровнем sFAS [1] и одновременно и с возрастом и полом, что может вызывать ложное представление о связи содержания sFAS и этих факторов). Отсутствие значимых различий между группами по среднему возрасту и соотношению мужчин и женщин, отсутствие корреляций с данными факторами в контрольной группе позволяет предположить отсутствие влияния пола и возраста на результаты данного исследования.

Можно предположить несколько причин повышения уровня sAPO-1 в сыворотке крови у больных эпилепсией как маркера заболевания или как патогенетического фактора. В частности, это может быть обусловлено повышением активности провоспалительных цитокинов при эпилепсии, а также инициацией апоптоза электрической эпилептиформной активностью, активацией апоптоза у пациентов с генетически детерминированной эпилепсией (в том числе при генетически детерминированных вариантах фокальных корковых дисплазий). Ряд исследований подтвердил наличие достоверных корреляций между частотой эпилептических припадков, временем от последнего приступа и уровнем sFAS [10], что может быть связано как с инициацией апоптоза эпилептиформной активностью, так и с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера во время приступа.

Выводы:

1. Выявлен достоверно более высокий уровень sAPO-1 (sFAS, sCD95) в группе пациентов с эпилепсией по сравнению с группой здоровых ($p=0,008$) и группой пациентов с

рассеянным склерозом ($p=0,0007$).

2. Не выявлено достоверных различий в группе пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом по сравнению с группой здоровых взрослых ($p=0,29$)

Список литературы

1. Аббасова С.Г., Высоцкий М.М., Овчинникова Л.К., Обушева М.Н., Дигаева М.А., Бритвин Т.А., Бахоева К.А., Карабекова З.К., Казанцева И.А., Мамедов У.Р., Манухин И.Б., Давыдов М.И. Растворимый Fas при онкологических заболеваниях // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. М.: АНО «Издательство РАМН». ISSN 0365-96152009. — № 10. — С. 442–446.
2. Белоусова Е.Д. Генетика эпилепсии: как и зачем обследовать детей с эпилепсией// Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика — № S1 (2014), М.: ИМА-Пресс, 2014, DOI: 10.14412/2074-2711-2014-1S-4-8, ISSN: 2074-2711. — С. 4–8.
3. Белоусова Е.Д., Никанорова М.Ю., Николаева Е.А. Наследственные болезни обмена, проявляющиеся в периоде новорожденности // Российский вестник перинатологии и педиатрии. М.: Национальная педиатрическая академия науки и инноваций. ISSN: 1027-4065— 2000. — Т. 45. — № 6. — С. 12–19.
4. Гатауллина С.Х., Мухин К. Ю., Петрухин А. С. Мезиальный височный склероз и его роль в развитии палеокортикальной височной эпилепсии (обзор литературы) // Русский журнал детской неврологии. М.: Издательский дом «АБВ-пресс». ISSN: 2073-88032008. Т. III. — № 3. — С. 31–40.
5. Кушлинский Н.Е., Бритвин Т.А., Полякова Г.А., Аббасова С.Г., Баронини А.А., Тишенина Р.С., Молчанова Г.С., Сельчук В.Ю., Пирогов Д.А., Богатырев О.П., Липкин В.М., Калинин А.П. Сравнительное исследование уровней растворимого FAS-антигена в сыворотке крови больных опухолями и опухолеподобными поражениями надпочечников// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. М.: АНО «Издательство РАМН». ISSN 0365-96152002. — № 8. — С. 197–201.
6. В.В. Пророков, Г.Х. Кусаинов, В.В. Делекторская, А.Г. Перевощиков. Растворимый Fas-антиген у больных раком толстой кишки // Сибирский онкологический журнал. — 2007. — № 1 (21). ISSN: 1814-4861.
7. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение водного и ионного баланса клетки // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 5.— С. 385–394
8. Chen J., Zhou T., Liu C. et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule // Science. — 1994. — Vol. 263.

9. David C Henshall and Roger P Simon. Epilepsy and apoptosis pathways// Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2005) 25, 1557–1572.

10. El-Hodhod MA, Tomoum HY, Abd Al-Aziz MM, Samaan SM. Serum Fas and Bcl-2 in patients with epilepsy// Acta Neurol Scand. 2006 May; 113(5):315-21.

Рецензенты:

Кравцов Ю. И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой неврологии им. проф. В.П. Первушина ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь;

Шестаков В. В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой неврологии с курсом нейрореабилитологии ФДПО ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь.