

О. В. ЕГОРКИНА¹, В. В. РЯЗАНЦЕВ²¹ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», Харьков²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Лактатдисক্রазія при боковом амиотрофічному склерозі

Цель — оценить активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови и ликворе больных боковым амиотрофическим склерозом (БАС) в качестве диагностического теста для оценки тяжести тканевой гипоксии.

Материалы и методы. В группу БАС были включены больные с достоверным диагнозом БАС, установленным на основании пересмотренных диагностических критериев El Escorial, которые проходили стационарное лечение в отделе нейроинфекций и рассеянного склероза Института неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины в 2012—2013 гг. Объект исследования — 45 проб сыворотки крови и 35 проб ликвора больных БАС, в которых кинетическим спектрофотометрическим методом определяли активность ЛДГ. Уровни ЛДГ в сыворотке крови и ликворе пациентов с разными формами БАС анализировали с учетом пола, оценки по шкале ALSFRS-R (Functional Rating Scale ALS, Revised) и длительности заболевания.

Результаты. Среди пациентов с повышенным уровнем ЛДГ в сыворотке крови 59% имели также повышенный уровень ЛДГ в ликворе. Источником ЛДГ в ликворе может быть плазма крови, так как у больных БАС уровень ЛДГ в крови в наибольшей степени повышается при развитии амиотрофий на стадии генерализации заболевания.

Выводы. Увеличение активности ЛДГ в сыворотке крови и ликворе, наблюдаемое у 40% пациентов, наиболее выражено на стадии генерализации заболевания и связано с дисфункцией дыхательной цепи митохондрий, приводящей к кислородному голоданию клеток, активации анаэробного гликолиза, являющегося причиной лактатацидоза. По содержанию этого фермента можно косвенно судить о выраженности процесса.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, лактатдегидрогеназа, лактатацидоз, тканевая гипоксия.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — нейродегенеративное заболевание, ассоциированное с селективной гибелью мотонейронов в нервной системе. Прогрессивная дегенерация двигательных нейронов приводит к гибели пациента через 3—5 лет после проявления заболевания. Болезнь разнообразна по клинической презентации, течению и прогрессированию. До сих пор не установлена точная причина болезни, механизмы ее прогрессирования, и, соответственно, нет эффективных средств для лечения этого заболевания.

В основе представлений о патогенезе БАС лежит концепция о его мультифакторности и о том, что БАС является конечным результатом множества патогенетических механизмов [3], включая не-

сколько универсальных механизмов повреждения нервной системы (эксайтотоксичность, оксидантный стресс, повреждение ДНК, митохондриальная дисфункция, нарушение деградации белков с образованием включений), а также нарушения цитоскелета, которые являются относительно специфичными для двигательной системы.

Ряд авторов [5] предлагают новую молекулярную модель патогенеза БАС, которая включает АТФ-зависимый нейронально-мышечный шаттл лактата (НМШЛ) в нервно-мышечном соединении (НМС), регулирующий поток лактата из мышц в нейроны и наоборот. Сбой НМШЛ из-за дисфункции дыхательной цепи предложено рассматривать как причину лактат-токсичности и дегенерации нервных окончаний в НМС, приводящих к денервации мышечного волокна. При критическом пороге,

© О. В. Егоркина, В. В. Рязанцев, 2014

когда денервация опережает реиннервацию, образуется порочный круг, когда оставшиеся иннервируемые мышечные волокна должны больше работать для компенсации нарушенного функционирования (что подтверждается нейрофизиологическими исследованиями гигантских F-волн или их блоков) и поэтому продуцируют токсичную концентрацию лактата, являющуюся причиной дальнейшей денервации и гибели нейронов. Этот механизм позволяет объяснить прогрессирование БАС, приводящее к обездвиженности.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — фермент, участвующий в процессе окисления глюкозы и образования молочной кислоты. ЛДГ является неспецифичным показателем тканевого повреждения — ее активность в сыворотке крови и ликворе используют как объективный диагностический тест для оценки тяжести кислородной недостаточности нервной ткани при заболеваниях нервной системы.

При полноценном снабжении кислородом лактат в крови не накапливается, а разрушается до нейтральных продуктов и выводится. В условиях гипоксии он накапливается, вызывая чувство мышечной усталости, и нарушает процесс тканевого дыхания.

Все заболевания, протекающие с разрушением клеток, сопровождаются резким повышением активности ЛДГ в сыворотке крови. Образующийся в ходе анаэробного гликолиза лактат диффундирует во внеклеточную жидкость и является причиной длительного лактатацидоза [2]. Таким образом, причиной повышения уровня лактата в крови чаще всего служит тканевая гипоксия (кислородное голодание клеток). По содержанию этого вещества можно косвенно судить о выраженности процесса. Однако метод определения содержания сывороточных ферментов имеет недостаточную чувствительность и специфичность для использования в качестве индекса неврологического повреждения.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что из-за выраженной защитной и регуляторной функции гематоэнцефалического барьера спинномозговая жидкость точнее отражает биохимические изменения, происходящие в мозге, чем кровь. Кроме того, на активность ЛДГ в крови значительное влияние оказывают физиологические и патологические процессы, происходящие во внутренних органах, что осложняет интерпретацию данных. С учетом этого при заболеваниях центральной нервной системы исследование спинномозговой жидкости, несмотря на большие методические трудности, наиболее целесообразно.

У здоровых людей показатели активности ЛДГ в ликворе существенно ниже, чем в сыворотке крови. Повышение уровня этого фермента в ликворе свидетельствует о нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера. По данным литературы, не выявлено корреляции между увеличе-

нием содержания в ликворе ЛДГ, креатинфосфокиназы (КФК) и их изоферментов и обширностью или тяжестью поражения мозга.

S. Vadakkadath Meethal и C. S. Atwood [5] предложили теорию о существовании НМШЛ для поддержания гомеостаза лактата в НМС (рис. 1). Согласно этой теории нарушение из-за дисфункции дыхательной цепи гипотетического АТФ-зависимого НМШЛ приводит к токсичности лактата и последующему разрушению НМС при БАС. Этот шаттл, действующий в НМС между мышечной клеткой и нервным окончанием, регулирует поток лактата от мышцы в нейрон (или наоборот). Активность НМШЛ зависит как от энергетического состояния, так и от порогового уровня толерантности к лактату мышечных клеток и нейронов, составляющих НМС. Поскольку энергетическое состояние клетки зависит от генерации АТФ, авторы предложили молекулярный механизм, включающий гликолиз, цикл Кребса и дыхательную цепь, основные метаболические составляющие которого представлены лактатом, малатом, оксалоацетатом, цитратом и аспартатом. Механизм может быть объяснен следующим образом. При нормальных состояниях клетки в дыхательной цепи образуется протон, необходимый для транспорта аспартата от митохондрий в цитозоль через шаттл аспартата (иначе аспартат не может пройти через митохондриальную мембрану). Аспартат в цитозоле может быть преобразован в оксалоацетат содержащейся в цитоплазме аспартатаминотрансферазой. Оксалоацетат, который не может пройти сквозь митохондриальную мембрану, преобразуется в малат содержащейся в цитоплазме малатдегидрогеназой, который в свою очередь может быть преобразован малеиновым ферментом в пируват. Оксалоацетат также может быть преобразован в фосфоенолпируват (ФЕП) фосфоенолпируват-карбоксилазой, содержащейся в цитоплазме. ФЕП может быть преобразован пируваткиназой в пируват, а тот в свою очередь — в лактат с помощью ЛДГ. Пируват также может объединиться с ацетил-КоА и быть вовлеченным в цикл Кребса для генерации цитрата вместе с оксалоацетатом через комплекс пируватдегидрогеназы в митохондриях. Цитрат через серию реакций в цикле Кребса, может регенерировать оксалоацетат и малат. Оксалоацетат может быть преобразован в аспартат аспартатаминотрансферазой в митохондриях. Малат и цитрат могут либо диффундировать, либо транспортироваться через митохондриальную мембрану белками-транспортёрами (см. рис. 1). Этот комплекс метаболических реакций происходит и в мышечных клетках, и в мотонейронах, составляющих НМС. Таким образом, при нормальных условиях повышению уровня лактата в НМС препятствует: 1) преобразование лактата в пируват, 2) нормальное функционирование митохондрий для генерации протонов и АТФ, 3) активность АТФ-зависимого НМШЛ.

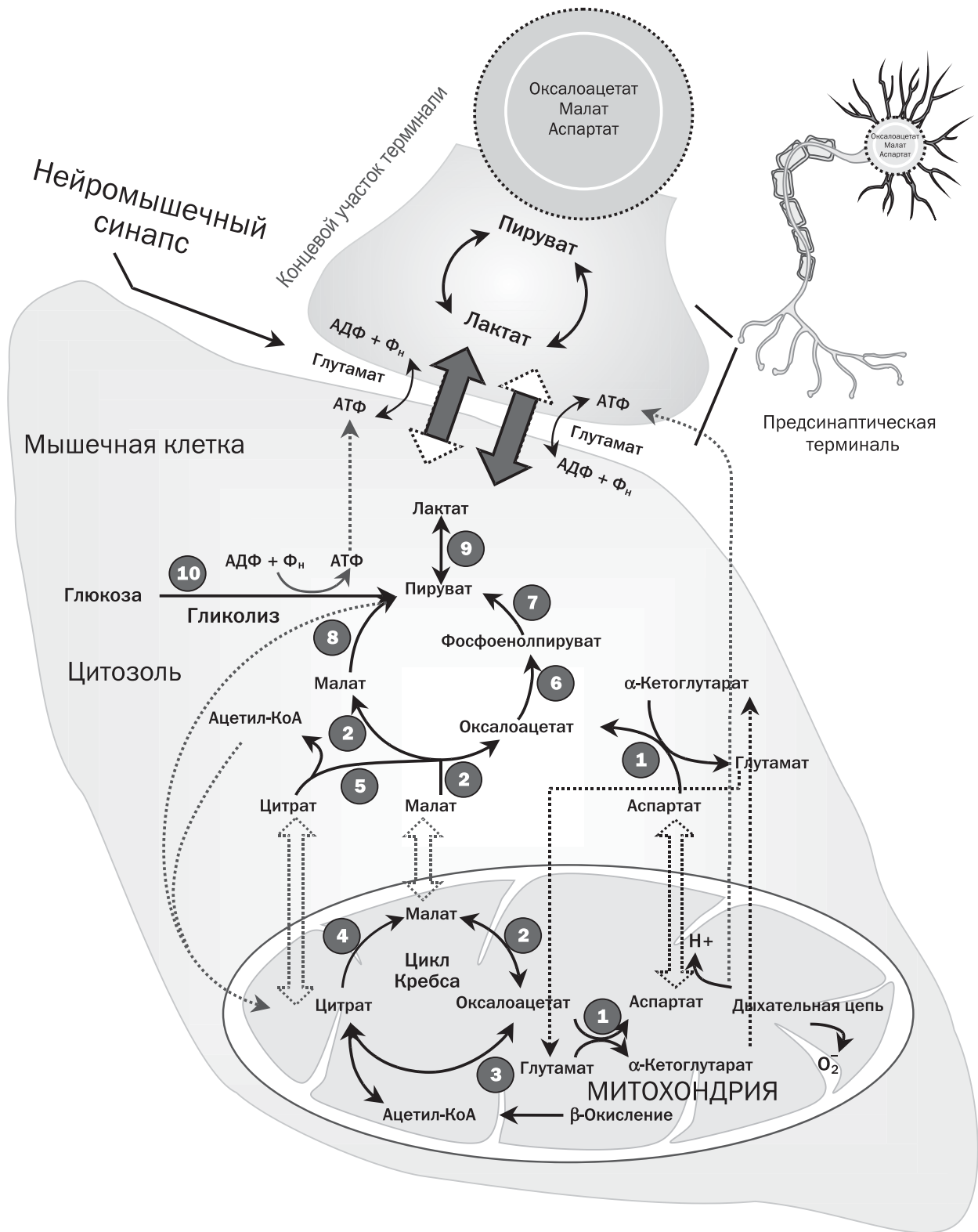


Рис. 1. Молекулярная модель патогенеза БАС (5). Пояснения в тексте

Когда дыхательная цепь больше не может поставлять протоны, необходимые для транслокации аспартата от митохондрий в цитоплазму клетки, накоплению аспартата в митохондриях препятствует преобразование оксалоацетата в аспартат аспартатаминотрансферазой (1). Накопленный оксалоацетат чаще преобразовывается в малат содер-

жащейся в митохондриях малатдегидрогеназой (2) или в цитрат с помощью цитратсинтазы (3). Цитрат может быть преобразован в малат ферментами цикла Кребса (4), такими как аконитаза, изоцитратдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинил-КоА-синтаза, сукцинатдегидрогеназа и фумараза. Малат и цитрат образуются либо диф-

Таблиця 1
 Распределение пациентов в зависимости от формы БАС и уровня ЛДГ в сыворотке крови

Показатель	Бульбарная БАС			Пояснично-крестцовая БАС			Шейно-грудная БАС		
	Женщины	Мужчины	Вместе	Женщины	Мужчины	Вместе	Женщины	Мужчины	Вместе
Уровень ЛДГ в пределах нормы	6	1	7	2	3	5	5	10	15
Уровень ЛДГ выше нормы	3	1	4	1	1	2	5	7	12
Всего	9	2	11	3	4	7	10	17	27

фузно, либо переносятся в цитоплазму неэнергетически зависимыми дикарбоксилатным и трикарбоксилатным носителями для преобразования в пируват. В цитоплазме малат с помощью малатдегидрогеназы преобразуется в оксалоацетат (2). Цитрат с помощью цитратлиазы расщепляется до оксалоацетата (5). Последний преобразуется фосфоенолпируват карбоксикиназой в фосфоенолпируват (6) или малатдегидрогеназой в малат (2). Цитоплазматические фосфоенолпируват и малат преобразуются в пируват с помощью пируваткиназы (7) и малеинового фермента (8) соответственно. Накопление пирувата будет ингибировать дальнейший гликолиз (10), и анаэробный метаболизм будет способствовать преобразованию пирувата с помощью содержащейся в цитоплазме лактатдегидрогеназы в лактат (9).

Дисфункция дыхательной цепи и неспособность ее вследствие этого поставлять протоны, необходимые для транслокации аспартата из митохондрий в цитоплазму клетки, могут привести к накоплению аспартата в митохондриях. Преобразование оксалоацетата в аспартат предотвращает это. Накопленный оксалоацетат будет преобразовываться в малат или цитрат, которые либо диффундируют, либо транспортируются в цитоплазму неэнергетически зависящими карбоксилатными переносчиками для преобразования в пируват (см. рис. 1). Это непрерывное накопление пирувата приводит к его активному преобразованию содержащейся в цитоплазме ЛДГ в лактат для поддержания синтеза АТФ путем гликолиза (см. рис. 1). Снижение дыхательной функции непосредственно ухудшит энергозависимый транспорт лактата, приводя к его накоплению в НМС, мышце и/или аксоне нерва. Накопление пирувата в цитоплазме будет сдерживать гликолитический путь генерации АТФ и протонов. Митохондриальная дисфункция и накопление лактата влияют на нейрон в большей степени, чем на миоцит, который, как предполагают, является более толерантным к высоким концентрациям лактата.

Таким образом, когда НМШЛ не осуществляет шаттл лактата из-за недостатка АТФ, накопление лактата может привести к дегенерации нервных окончаний [6] и дисфункции НМС. Потеря НМС приведет

к компенсаторной чрезмерной активности оставшихся НМС и мышечных волокон, что будет способствовать увеличению продуцирования лактата и/или других токсичных радикалов и возникновению порочного круга, который будет причиной двигательной нейротоксичности, приводящей к атрофии мышц и, в конечном итоге, — к обездвиженности.

Цель работы — оценить активность ЛДГ в сыворотке крови и ликворе больных БАС в качестве диагностического теста для оценки тяжести тканевой гипоксии.

Материалы и методы

Изучены уровни активности метаболического фермента — ЛДГ в сыворотке крови (у 23 мужчин и 22 женщин) и ликворе пациентов с БАС.

Активность ЛДГ определяли при помощи набора реагентов производства DAC-SpectroMed S. R.L. кинетическим спектрофотометрическим методом.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Для оценки достоверности различий двух величин использовали параметрический критерий Стьюдента. Критический уровень значимости принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Уровень ЛДГ был повышен у 18 (40%) пациентов (в среднем до $(561,43 \pm 103,82)$ МЕ/л), у остальных пациентов он находился в пределах нормы (в среднем — $(312,08 \pm 87,03)$ МЕ/л).

Данные об уровне ЛДГ в сыворотке крови при разных формах БАС представлены в табл. 1, данные об уровне ЛДГ в сыворотке крови в зависимости от пола — в табл. 2.

Таблиця 2
 Средний уровень ЛДГ в сыворотке крови у пациентов с БАС, МЕ/л

ЛДГ	Женщины (n = 22)	Мужчины (n = 23)
В пределах нормы	331,14 ± 77,16 (n = 13)	294,39 ± 96,62 (n = 14)
Выше нормы	554,40 ± 76,33 (n = 9)	568,46 ± 130,25 (n = 9)

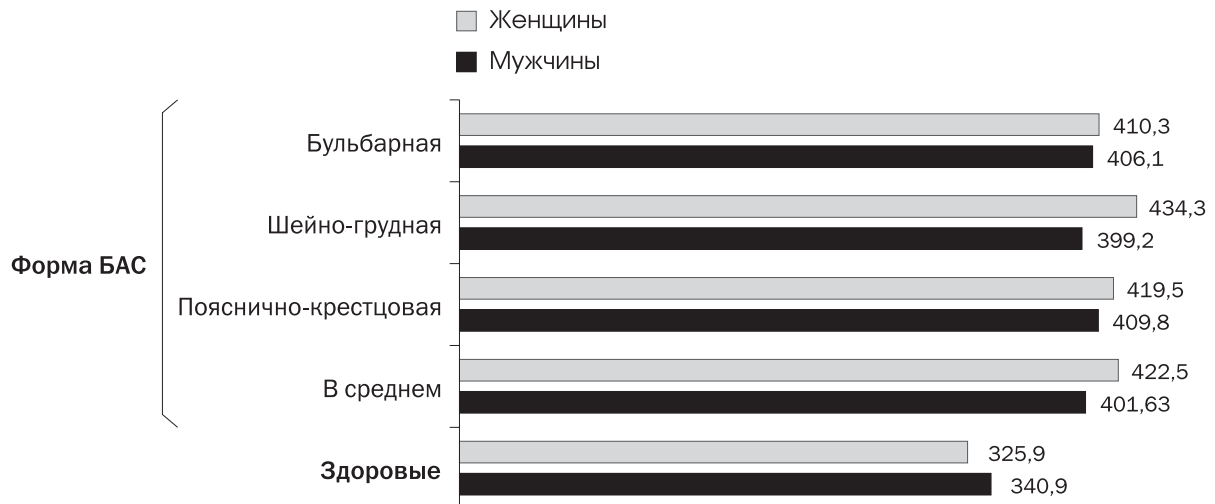


Рис. 2. Средние показатели уровня ЛДГ у пациентов с БАС и здоровых людей

Средние значения уровня ЛДГ и у мужчин, и у женщин с БАС (соответственно $401,63 \pm 173,68$) и $(422,47 \pm 135,07)$ МЕ/л) были выше средних значений у здоровых людей ($340,90$ и $325,90$ МЕ/л) [1], но без статистически значимых отличий (рис. 2). Различия между мужчинами и женщинами по формам заболевания были недостоверными.

Установлено, что при всех формах заболевания более половины пациентов имеют нормальный уровень ЛДГ (рис. 3).

Наибольшее повышение активности ЛДГ отмечено у пациентов с длительностью заболевания от 2 до 3 лет, но оно не было статистически значимым (рис. 4). Можно предположить, что уровень ЛДГ в крови больных БАС в наибольшей степени повышается при развитии амиотрофий на стадии генерализации заболевания.

В группе больных БАС не выявлено корреляции активности ЛДГ в сыворотке крови с оценкой по шкале ALSFRS-R и длительностью заболевания (рис. 5).

В группу пациентов с БАС, у которых в ликворе была измерена активность ЛДГ, вошло 35 человек. Группу сравнения составили 10 пациентов с другими неврологическими заболеваниями, включая мышечные.

Активность ЛДГ в ликворе пациентов с БАС ($49,96$ МЕ/л) была выше максимального референсного значения ($40,00$ МЕ/л), но различия были статистически недостоверны. Этот показатель в крови пациентов с другими неврологическими заболеваниями составил $64,15$ МЕ/л.

Средний уровень ЛДГ в ликворе у женщин и мужчин статистически не отличался и составил $47,86$ и $50,37$ МЕ/л соответственно. Уровень активности ЛДГ в ликворе пациентов с бульбарной, шейно-грудной и пояснично-крестцовой формами БАС также статистически не отличался и составил $60,45$; $42,94$ и $58,73$ МЕ/л соответственно.

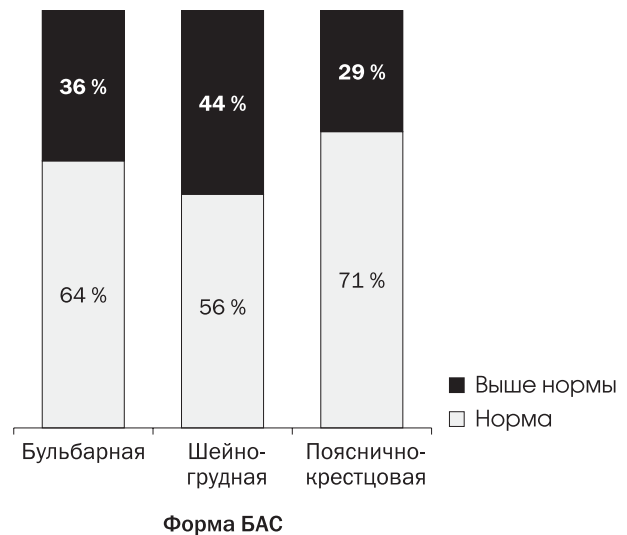


Рис. 3. Доля пациентов с разными формами БАС, имеющих повышенный или нормальный уровень ЛДГ

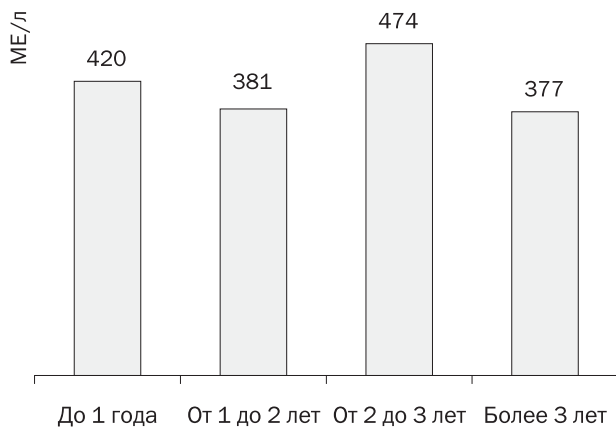


Рис. 4. Средние значения уровня ЛДГ в сыворотке крови пациентов с БАС с разной длительностью заболевания

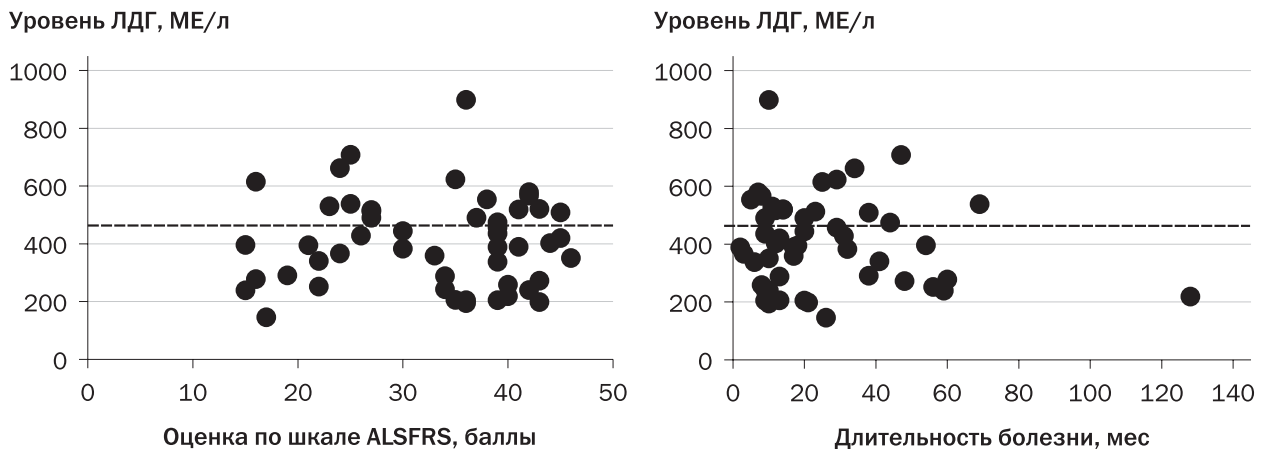


Рис. 5. Корреляция уровня ЛДГ в сыворотке с оценкой по шкале ALSFRS-R и длительностью заболевания (пунктирная линия — максимальное референсное значение)

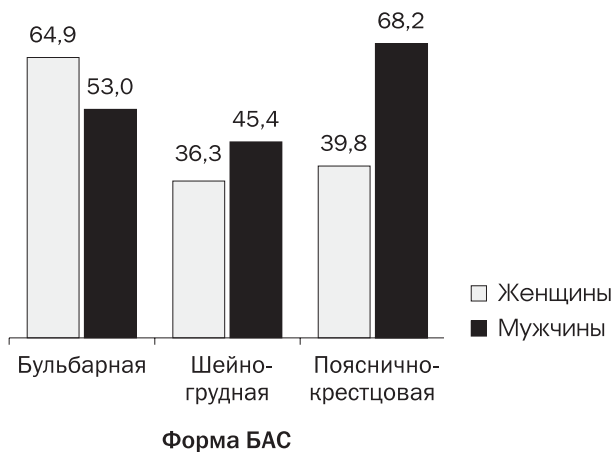


Рис. 6. Средний уровень ЛДГ в ликворе в зависимости от формы БАС и пола

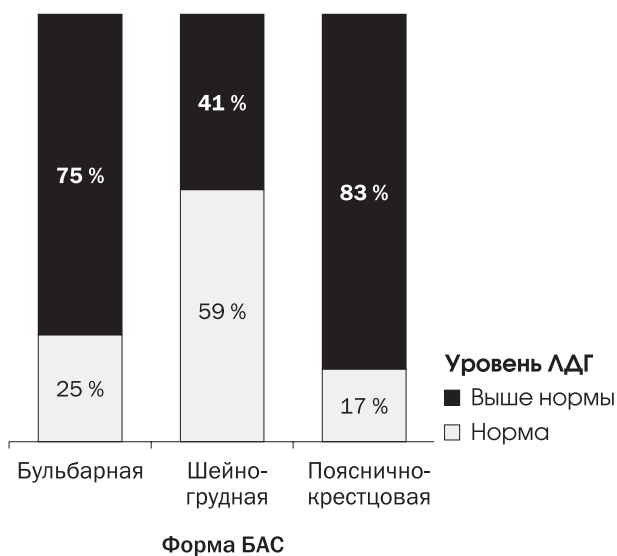


Рис. 7. Распределение пациентов с разными формами БАС в зависимости от уровня ЛДГ в ликворе по отношению к норме

Средние значения уровней ЛДГ в ликворе были выше максимального референсного значения для здоровых людей у женщин — при бульбарной форме, у мужчин — при всех формах заболевания, но без достоверных различий. Различия в средних значениях уровней ЛДГ между женщинами и мужчинами также были статистически недостоверны (рис. 6).

Не выявлено значимых различий в среднем уровне ЛДГ в ликворе между формами БАС.

При бульбарной и пояснично-крестцовой формах БАС было больше пациентов с повышенным уровнем ЛДГ в ликворе (рис. 7).

Корреляции активности ЛДГ в ликворе с оценкой по шкале ALSFRS-R и длительностью заболевания (рис. 8) не выявлено.

Исходя из представлений о преимущественно мозговом происхождении ЛДГ в ликворе, можно предположить, что в ткани мозга больных усиливается активность анаэробных гликолитических процессов. Причиной повышения содержания ЛДГ в ликворе может быть активация анаэробного гликолиза и гибель нейронов в условиях гипоксии у пациентов с дыхательными нарушениями. Источником ЛДГ в ликворе может быть также плазма крови, так как у больных БАС уровень ЛДГ в крови наиболее выражено повышается при развитии амиотрофий на стадии генерализации заболевания. В рамках проведенной работы установить причину повышения активности ЛДГ в ликворе больных БАС не представлялось возможным. Согласно данным литературы, повышение активности ЛДГ в ликворе наблюдается при воспалительных заболеваниях ЦНС и опухолях головного мозга [4].

Выводы

Среди пациентов с повышенным уровнем ЛДГ в сыворотке крови 59 % имели также повышенный уровень ЛДГ в ликворе. Увеличение активности ЛДГ в сыворотке крови и ликворе, наблюдаемое у 40 % пациентов, наиболее выражено на стадии

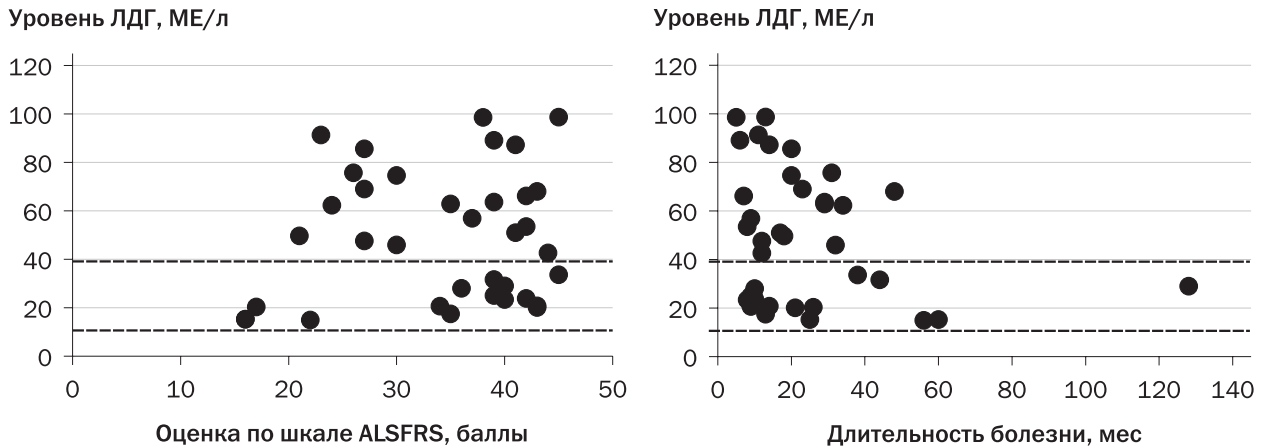


Рис. 8. Корреляція рівня ЛДГ в ликворі пацієнтів з БАС з тяжкістю і тривалістю захворювання

генералізації захворювання і, очевидно, пов'язано з дисфункцією дихальної ланки мітохондрій, приводящої до кислородного голодування кліток, активації анаеробного гліколізу, являючогося причиною лактацидоза. Предположительно, по содержанию этого фермента можно косвенно судить о выраженности процесса.

Перспективою досліджень вважається вивчення зв'язи між підвищенням активності ЛДГ, викликаним гибелью нейронів в умовах гіпоксії, і активністю КФК в ликворі хворих БАС.

Вопрос о значении активности ЛДГ в сыворотке крови и ликворе у больных с разными формами БАС остается открытым.

Литература

1. Журкина О. В. Лактатдегидрогеназа крови и мочи при доброкачественных и злокачественных новообразованиях почки // Сиб. онкол. журн. — 2008. — № 1 (25). — С. 103—105.
2. Каасик А. — Э. Внеклеточный ацидоз головного мозга и его патофизиологическое значение: (экспериментальное и клинико-биохимическое исследование): Автореферат / Тартус. гос. ун-т. — Тарту: Tartu Riiklik Ülikool, 1972. — 64 с.
3. Armon C. Acquired nucleic acid changes may trigger sporadic amyotrophic lateral sclerosis // Muscle & Nerve. — 2005. — Vol. 32. — P. 273—377.
4. Nussinovitch M., Prais D., Finkelstein Y. et al. Lactic dehydrogenase isoenzymes in cerebrospinal fluid of children with Guillain-Barré syndrome // Arch. Dis. Child. — 2002. — Vol. 87 (3). — P. 255—256.
5. Vadakkadath Meethal S., Atwood C. S. Lactate dyscrasia: A novel explanation for amyotrophic lateral sclerosis // Neurobiol. Aging. — 2012. — Vol. 33 (3). — P. 569—581.
6. Vijayvergiya C., Beal M. F., Buck J. et al. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice // J. Neurosci. — 2005. — Vol. 25. — P. 2463—2470.

О. В. ЄГОРКІНА¹, В. В. РЯЗАНЦЕВ²

¹ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», Харків

²Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

Лактатдисক্রазія при бічному аміотрофічному склерозі

Мета — оцінити активність ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у сироватці крові та лікворі хворих на бічний аміотрофічний склероз (БАС) як діагностичного тесту для оцінки тяжкості тканинної гіпоксії при БАС.

Матеріали і методи. У групу БАС залучено хворих з достовірним діагнозом БАС, визначеним на підставі переглянутих діагностичних критеріїв El Escorial, які проходили стаціонарне лікування у відділі нейроінфекцій та розсіяного склерозу Інституту неврології, психіатрії та наркології НАМН України у 2012—2013 рр. Об'єкт дослідження — 45 проб сироватки крові та 35 проб ліквору хворих на БАС, в яких кінетичним спектрофотометричним методом визначали активність ЛДГ. Рівні ЛДГ у сироватці крові та лікворі пацієнтів з різними формами БАС аналізували з урахуванням статі, оцінки за шкалою ALSFRS-R (Functional Rating Scale ALS, Revised) і тривалості захворювання.

Результати. Серед пацієнтів з підвищеним рівнем ЛДГ у сироватці крові 59% мали також підвищений рівень ЛДГ у лікворі. Джерелом ЛДГ у лікворі може бути плазма крові, оскільки у хворих на БАС рівень ЛДГ у крові найбільш виражено підвищується при розвитку аміотрофій на стадії генералізації захворювання.

Висновки. Збільшення активності ЛДГ у сироватці крові та лікворі, яке спостерігається у 40% пацієнтів, найбільш виражене на стадії генералізації захворювання і пов'язане з дисфункцією дихального ланцюга мітохондрій, що призводить до кисневого голодування клітин, активації анаеробного гліколізу, який спричиняє лактатацидоз. За вмістом цього ферменту можна побічно судити про вираженість процесу.

Ключові слова: бічний аміотрофічний склероз, лактатдегідрогеназа, лактатацидоз, тканинна гіпоксія.

O. V. EGORKINA ¹, V. V. RYAZANTSEV ²

¹SI «Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of NAMS of Ukraine», Kharkiv

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, Kharkiv

Lactate dyscrasia in amyotrophic lateral sclerosis

Objective — to evaluate the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) as a diagnostic test to assess the severity of tissue hypoxia in ALS.

Methods and subjects. In a group of ALS there were included patients, who had ALS as defined by revised El Escorial diagnostic criteria and underwent inpatient treatment in the department of neural infections and multiple sclerosis of SI INPN NAMSU in 2012—2013. The object of the study was 45 serum samples and 35 samples of cerebrospinal fluid of ALS patients. Determination of the LDH level was held by kinetic spectrophotometric method. LDH levels in serum and cerebrospinal fluid of patients with different forms of ALS were considered by gender, ALSFRS-R (Functional Rating Scale ALS, Revised) score and duration of the disease.

Results. Analysis of the data showed that among patients who had elevated levels of LDH in the blood serum, 59% had elevated levels of LDH in the cerebrospinal fluid. The source of LDH in the cerebrospinal fluid may also be blood plasma, as the ALS patients LDH level in the blood is most pronounced increases with the development of amyotrophy on the stage of generalization of the disease.

Conclusions. We think, the increase in LDH activity in the serum and cerebrospinal fluid observed in 40% of patients most expressed at the stage of generalization of the disease and is associated with a dysfunction of the mitochondrial respiratory chain leading to cells «hypoxia», activation of anaerobic glycolysis leading to lactic acidosis, and the content of this enzyme can indirectly conclude the severity of the process.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, lactate dehydrogenase, lactic acidosis, tissue hypoxia.