

9. Poortmans J. R., Kumps A., Duez P., Fofonka A. et al. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2005. – **37**, No 10. – P. 1717–1720.
10. Yu P. H., Deng Y. L. Potential Cytotoxic Effect of Chronic Administration of Creatine, a Nutrition Supplement to Augment Athletic Performance // *Medical Hypothesis.* – 2000. – **54**. – P. 726–728.
11. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism // *Physiol. Rev.* – 2000. – **80**, No 3. – P. 1107–1213.
12. Ernst P. B., Gold B. D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – **54**. P. 614–615.
13. Циммерман Я. С. Этиология, патогенез и лечение язвенной болезни, ассоциированной с *Helicobacter pylori*-инфекцией: состояние проблемы и перспективы // *Клин. медицина.* – 2006. – **84**, № 3. – С. 9–19.
14. Avidar G. A simple spectrometric determination of formaldehyde and other aldehydes: application to periodate oxidized glycerol system // *Anal. Biochem.* – 1983. – **134**. – P. 499–504.

*Институт экогигиены и токсикологии  
им. Л. И. Медведя, Киев*

*Поступило в редакцию 16.03.2007*

УДК 616.831:577.122+577.125

© 2007

**Т. М. Кучмеровская, Н. М. Гурина, И. А. Шиманский,**  
член-корреспондент НАН Украины **Г. В. Донченко, С. М. Супрун,**  
**А. П. Клименко**

## **Системные биохимические нарушения при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите**

*Reduced levels of total lipids and cholesterol in blood serum were shown after 10 days of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induction. The elevated content of blood serum phospholipids was observed after 18 days of EAE duration. These alterations were accompanied by the progressive increase in both the total proteolytic activity and acid phosphatase activity with a decreasing effect on alkaline phosphatase in blood serum. Compared to control, the blood content of vitamin B<sub>12</sub> was twice lower in the period as early as 10 days after EAE induction. Our findings suggest the presence of system biochemical impairments, which most likely reflect the degree of EAE-related destructive changes in brain and may be of significance as diagnostic and prognostic criteria for multiple sclerosis management.*

Рассеянный склероз является хронической патологией ЦНС, в основе которой лежит воспалительный процесс, прогрессирующая демиелинизация и повреждение аксонов. Заболевание характеризуется развитием многочисленных склеротических очагов преимущественно в белом веществе головного и спинного мозга, а также значительными функциональными нарушениями. Клиническими проявлениями рассеянного склероза являются нарушения в двигательной, координаторной, чувствительной сферах, расстройства зрения, а также изменения интеллекта. Деструкция миелиновой оболочки нервных волокон протекает на фоне угнетения синтетических и активации аутолитических процессов обмена белков, липидов и других соединений, что может приводить к накоплению в системном кровотоке избыточного количества продуктов деградации миелина. В конечном итоге развитие патологии, ассоциированное со структурными и функциональными изменениями нервной ткани,

может сопровождаться серьезными метаболическими нарушениями не только в ЦНС, но и в других органах и системах организма [1].

Ранее на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) у морских свинок нами обнаружено нарушение функционирования серотонинэргической медиаторной системы, а также значительное снижение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в гомогенатах мозга и седалищного нерва [2]. Эти изменения наблюдались уже в ранние сроки развития патологии. На этих же этапах заболевания нами было отмечено повышение соотношения лактат/пируват и НАДН/НАД<sup>+</sup> в головном мозге и седалищном нерве, что свидетельствует о нарушении нормальных регуляторных взаимоотношений системы никотинамидных нуклеотидов с различными метаболическими путями углеводного, энергетического и липидного обмена при ЭАЭ. Выявленные нами изменения в функционировании отдельных звеньев энергетического обмена могут быть причиной дисбаланса белкового и липидного обмена при ЭАЭ.

В связи с вышеизложенным нами проведено исследование возможных биохимических нарушений белкового и липидного обмена на ранних сроках развития ЭАЭ у морских свинок.

ЭАЭ у грызунов является наиболее адекватной моделью для исследования патогенетических механизмов, лежащих в основе развития и протекания рассеянного склероза. ЭАЭ моделировали на морских свинках массой 300–400 г однократной подкожной инокуляцией (в подушечки задних лапок) 100 мкг (сырая масса) препарата основного белка миелина в смеси с 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда [3].

Основной белок миелина был выделен из белого вещества головного мозга быка методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [4]. Процесс демиелинизации нервной ткани контролировали с помощью электронной микроскопии.

Животных с ЭАЭ декапитировали через 10 сут (ЭАЭ-I, латентный период развития заболевания) и 18 сут (ЭАЭ-II, период развития характерных признаков) после сенсibilизации.

Содержание общих липидов, холестерина и фосфолипидов в сыворотке крови определяли с помощью стандартных наборов bioMerieux” (Франция).

Активности кислой и щелочной фосфатаз рассчитывали согласно методом W. H. Fishman с соавт. и O. A. Vessey с соавт. [5, 6], а сериновых протеиназ с трипсиноподобной активностью — по методу К. Н. Веремеенко с соавт. [7].

Уровень витамина В<sub>12</sub> оценивали микробиологическим методом [8].

Содержание белка определяли по методу Лоури. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного *t* критерия Стьюдента для некоррелированных выборок.

Как известно, для рассеянного склероза характерна деградация структурных компонентов миелиновых мембран в результате нарушения их обмена. Изменения липидного состава нервной ткани происходят уже на ранних стадиях развития процесса миелинолизиса. Имеются сведения, что при ЭАЭ фосфолипиды ткани мозга подвержены существенным качественным и количественным изменениям. Показано, что в латентном периоде развития ЭАЭ нарушен процесс синтеза лецитина и инозитолсодержащих фосфолипидов, тогда как на более поздней стадии, характеризующейся появлением параличей, отмечается значительное снижение содержания цереброзидов, сульфатидов и ганглиозидов, а также повышение содержания сфингомиелина [9, 10]. Кроме того, полагают, что одним из наиболее уязвимых звеньев в молекулярном комплексе липидного слоя миелина является холестерин. Действи-

тельно, в очагах демиелинизации отмечается появление эфиров холестерина, в то время как содержание свободного холестерина снижается [11].

На сегодня отсутствуют данные, которые позволяли бы оценить насколько липидный состав крови может отражать изменение их содержания в головном мозге в зависимости от стадии развития рассеянного склероза. Учитывая изложенное, мы считали целесообразным провести определение содержания общих липидов, фосфолипидов и общего холестерина в сыворотке крови морских свинок на разных стадиях развития ЭАЭ. Результаты исследований показали (табл. 1), что на 10-е сут после сенсibilизации животных основным белком миелина содержание общих липидов и холестерина сыворотки крови снижается по сравнению с контрольными животными на 18,6 и 29,0% соответственно, в то время как содержание фосфолипидов остается неизменным. Следует отметить, что на стадии развития ЭАЭ-II, т.е. когда развиваются характерные признаки заболевания, уровни общих липидов и холестерина возвращаются до показателей контрольных животных, а содержание фосфолипидов повышается на 23,1%.

Тот факт, что на более поздней стадии развития ЭАЭ у морских свинок исследуемые показатели изменялись менее выражено, может свидетельствовать о том, что наиболее быстрые и существенные изменения в ходе развития этого заболевания происходят уже на его ранних стадиях. Можно предположить, что повышение уровня фосфолипидов в системном кровотоке на стадии развития ЭАЭ-II связано с процессом продолжающейся деструкции миелина и является результатом значительного нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Поскольку фосфолипидам принадлежит важное место в структурно-функциональной организации плазматических мембран, то обнаруженные нами изменения в содержании фосфолипидов сыворотки крови могут отражать деструктивные процессы в нервной ткани при ЭАЭ, т.е. носить специфический для этого заболевания характер. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей, свидетельствующими об изменении качественного и количественного состава некоторых индивидуальных фосфолипидов при ЭАЭ, в частности, в синаптосомальной фракции головного мозга [12].

Что касается снижения содержания общих липидов и холестерина при ЭАЭ, то не исключено, что помимо структурно-функциональных нарушений в мембранах нервных клеток в эти изменения могут быть вовлечены и другие патогенетические механизмы, в частности связанные с нарушениями липидного обмена. Известно, что нормальное протекание процессов липидного обмена имеет огромное значение для функционирования нервной системы, а их нарушения могут способствовать развитию различных заболеваний ЦНС, включая рассеянный склероз.

Нам представлялось интересным выявить и проанализировать другие возможные биохимические отклонения, которые могут иметь место при развитии экспериментального де-

Таблица 1. Содержание липидов в сыворотке крови морских свинок в динамике развития ЭАЭ ( $M \pm m$ ,  $n = 12 \div 14$ )

Фракция липидов	Физиологическое состояние		
	Контроль	ЭАЭ-I (10 сут)	ЭАЭ-II (18 сут)
Общие липиды, г/л	$2,79 \pm 0,21$	$2,27 \pm 0,20^*$	$2,64 \pm 0,21$
Общий холестерин, ммоль/л	$2,07 \pm 0,22$	$1,47 \pm 0,12^*$	$1,97 \pm 0,13$
Фосфолипиды, ммоль/л	$0,65 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,04^*$

\*Вероятность различия между показателями контрольной и опытной групп ( $p < 0,05$ ).

миелинизирующего процесса. Одним из важнейших факторов, способствующих развитию процесса миелинолизиса, принято считать активацию протеолитических ферментов ткани мозга при ЭАЭ. Полагают, что после освобождения основного белка миелина из миелинового комплекса, причина которого окончательно не установлена, белок становится доступен воздействию лизосомальных протеаз [13].

Повышение активности этих ферментов в большинстве случаев, как принято считать на сегодня, происходит в результате увеличения интенсивности пероксидного окисления в биомембранах, изменения рН среды на фоне хронически протекающего воспалительного процесса. Это приводит к расщеплению основного белка миелина на фрагменты — энцефалитогенные пептиды, которые, являясь аутоантигенами, вовлекаются в иммунопатологический процесс [14].

Нами было проведено определение активности трипсиноподобных протеиназ сыворотки крови морских свинок в динамике развития ЭАЭ (табл. 2). Показано, что ферментативная активность повышается уже в латентном периоде развития заболевания на 33,6% по сравнению с контролем. К периоду развития характерных признаков патологии происходит дальнейшее повышение протеолитической активности сыворотки крови — на 50,6% по сравнению с контролем. Активация протеолитических ферментов может быть следствием избыточного накопления в крови продуктов деградации белковых компонентов миелиновой оболочки, которые образуются в процессе демиелинизации нервных волокон.

Определение содержания общего белка плазмы крови морских свинок в динамике развития ЭАЭ показало, что на 10-е сут после сенсibilизации животных основным белком миелина данный показатель достоверно снижен на 16,0%. При наличии характерных признаков ЭАЭ у животных уровень общего белка плазмы крови не отличается от такового у контрольных животных, несмотря на свойственные для ЭАЭ активацию аутолитических процессов, а также нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера.

В динамике развития ЭАЭ была также определена активность кислой и щелочной фосфатаз в сыворотке крови морских свинок. В латентном периоде развития демиелинизирующего процесса наблюдалось увеличение активности кислой фосфатазы в сыворотке крови экспериментальных животных на 48,7% и общей протеолитической активности на 33,6% по сравнению с соответствующим контролем (см. табл. 2). В период развития у морских свинок характерных для ЭАЭ-II неврологических симптомов заболевания мы отмечали дальнейшее увеличение активности фермента, а также общей протеолитической активности сыворотки крови соответственно на 81,5 и 50,6% по сравнению с контролем. При этом активность щелочной фосфатазы сыворотки снижалась и в латентном периоде ЭАЭ-I у морских свинок была на 37,8% ниже, чем в контроле, а на стадии ЭАЭ-II — на 58,7%. Наряду со снижением активности щелочной фосфатазы, накопление в крови продуктов метаболизма возможно за счет процессов миелинолизиса, косвенным подтверждением чего может служить наблюда-

Таблица 2. Активность гидролитических ферментов сыворотки крови морских свинок в динамике развития ЭАЭ, мкмоль/(мин · л сыворотки) ( $M \pm m$ ,  $n = 14$ )

Ферментативная активность	Физиологическое состояние		
	Контроль	ЭАЭ-I (10 сут)	ЭАЭ-II (18 сут)
Трипсиноподобные протеиназы	59,94 ± 1,85	80,07 ± 6,92*	90,26 ± 5,87*
Кислая фосфатаза	30,76 ± 1,42	45,74 ± 1,85*	55,83 ± 5,95*
Щелочная фосфатаза	441,00 ± 31,50	274,20 ± 21,90*	182,20 ± 13,90*

\*Вероятность различия между показателями контрольной и опытной групп ( $p < 0,05$ ).

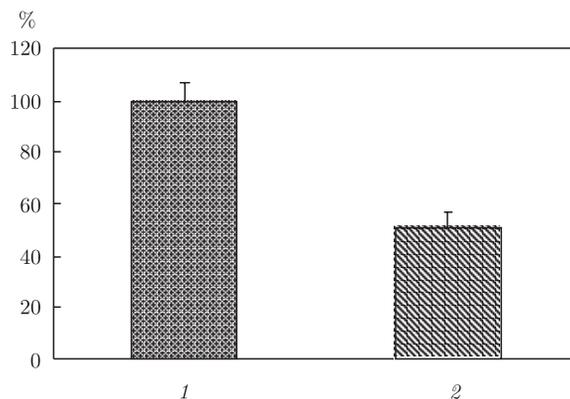


Рис. 1. Содержание витамина В<sub>12</sub> в сыворотке крови морских свинок в контроле (1) и на 18-е сут ЭАЭ (2) ( $M \pm m, n = 7$ )

емое увеличение в плазме крови животных содержания фосфолипидов (см. табл. 1). В период ЭАЭ-II у морских свинок более выражена интоксикация организма за счет активно текущего демиелинизирующего процесса в мозге.

Обнаруженные нами изменения активностей щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных могут быть использованы как показатели, характеризующие изучаемую патологию ЦНС, а также эффективность возможных способов ее коррекции.

Полученные нами данные в некоторой степени согласуются с данными других исследователей, продемонстрировавших, что развитие ЭАЭ у морских свинок сопровождается повышением в мозге активности кислой фосфатазы, в то время как активность щелочной фосфатазы остается без изменений [15].

В последнее время появляется все больше сведений о применении витаминов в комплексной терапии больных рассеянным склерозом, а также при ЭАЭ у животных. Известно, что витамин В<sub>12</sub> является кофактором формирования миелина и проявляет иммуномодуляторные и нейротропные свойства. Данный витамин необходим для синтеза S-аденозинметионина, который служит донором метильных групп для метилирования белков и ДНК. Было показано, что содержание витамина В<sub>12</sub> в сыворотке крови морских свинок уже на стадии ЭАЭ-I снижается в 2 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 1). Вполне вероятно, что существенное снижение уровня витамина В<sub>12</sub> в сыворотке крови при ЭАЭ связано с нарушением как всасывания и транспорта витамина, так и его рецепции специфическими белками.

Таким образом, изменения липидного состава, активности гидролитических ферментов сыворотки крови, а также низкая обеспеченность организма витамином В<sub>12</sub> при ЭАЭ у морских свинок могут служить показателями, характеризующими изучаемый патологический процесс, а также эффективность способов его коррекции, что может иметь определенное диагностическое и прогностическое значение. Полученные данные свидетельствуют о наличии интоксикации организма за счет протекающего демиелинизирующего процесса в мозге, который приобретает интенсивный характер уже на ранних стадиях развития заболевания.

1. Behi M. E., Dubucquoi S., Lefranc D. et al. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis // Immunol. Lett. – 2005. – 96. – P. 11–26.

2. Кучмеровская Т. М., Шиманский И. А., Донченко Г. В. и др. Некоторые показатели функционально-биохимического состояния нервной системы при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите у морских свинок // Нейрохимия. – 2002. – **19**, № 3. – С. 203–208.
3. Житниухин Ю. Л., Литвиненко И. В., Огурицов Р. П. Влияние никотинамида на развитие экспериментального аллергического энцефаломиелита // Биол. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – **125**, № 2. – С. 180–182.
4. Палладін А. В., Терлецька Я. Т., Козулїна О. П. Білки структурних утворень тканини головного мозку // Укр. біохім. журн. – 1970. – **42**, № 2. – С. 144–154.
5. Fishman W. H., Lerner F. A. A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin // J. Biol. Chem. – 1953. – **200**, No 1. – P. 89–97.
6. Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum // J. Biol. Chem. – 1946. – **164**, No 3. – P. 321–329.
7. Веремеенко К. Н., Волохонская Л. И., Кизим А. И. и др. Методы определения прекалликреин-калликреиновой системы в крови человека: (Метод. рекомендации). – Киев, 1978. – 14 с.
8. Островский Ю. М. Экспериментальная витаминология. – Минск: Наука и техника, 1979. – С. 452–456.
9. Albers J. J., Marcovina S. M., Christenson R. H. Lecithin cholesterol acyltransferase in human cerebrospinal fluid: reduced level in patients with multiple sclerosis and evidence of direct synthesis in the brain // Int. J. Clin. Lab. Res. – 1992. – **22**, No 3. – P. 169–172.
10. Marbois B. N., Faull K. F., Fluharty A. L. et al. Analysis of sulfatide from rat cerebellum and multiple sclerosis white matter by negative ion electrospray mass spectrometry // Biochim. et biophys. acta. – 2000. – **1484**, No 1. – P. 59–70.
11. Ferretti G., Bacchetti T., Principi F. et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity // Mult. Scler. – 2005. – **11**, No 6. – P. 677–682.
12. Salvati S., Attorri L., Confaloni A., Di Biase A. Lipid changes in central nervous system membranes in experimental allergic encephalomyelitis (EAE) // Neurochem. Res. – 1990. – **15**, No 11. – P. 1051–1053.
13. Roberts R. Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins // Drug News Perspect. – 2005. – **18**, No 10. – P. 605–614.
14. Fontoura P., Garren H., Steinman L. Antigen-specific therapies in multiple sclerosis: going beyond proteins and peptides // Int. Rev. Immunol. – 2005. – **24**, No 5–6. – P. 415–446.
15. Aoyagi T., Wada T., Ishikawa Y. et al. Systemic enzymatic changes in guinea pigs suffering from experimental allergic encephalomyelitis // J. Pharmacobiodyn. – 1983. – **6**. – P. 963–973.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев  
Институт экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого  
НАН Украины, Киев*

*Поступило в редакцию 16.02.2007*