Активность цитохром *c*-оксидазы и количество подобного глутаминсинтетазе белка в тромбоцитах при синдроме мягкого когнитивного снижения

Г.Ш. БУРБАЕВА[1], И.С. БОКША[1]*, О.К. САВУШКИНА[1], М.С. ТУРИЩЕВА[1], Е.Б. ТЕРЕШКИНА[1], Л.И. СТАРОДУБЦЕВА[1], С.И. ГАВРИЛОВА[1], Я.Б. ФЕДОРОВА[1], И.А. ЖУРАВИН[2]

Platelet cytochrome c-oxidase and glutamine synthetase-like protein in patients with mild cognitive impairment

G.SH. BURBAEVA, I.S. BOKSHA, O.K. SAVUSHKINA, M.S. TURISHCHEVA, E.B. TERESHKINA, L.I. STARODUBTSEVA, S.I. GAVRILOVA, Y.B. FEDOROVA, I.A. ZHURAVIN

[1]Научный центр психического здоровья РАМН, Москва [2]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Исследование проводилось с целью разработки методов доклинической диагностики и в дальнейшем — превентивной терапии болезни Альцгеймера (БА) у пациентов с синдромом мягкого когнитивного снижения (МКС). Обследовали группу лиц с МКС — 44 человека и группу больных БА — 42 (18 с мягкой деменцией и 24 — с умеренной). Контрольная группа состояла из 24 психически здоровых родственников больных. Изучали связь между активностью/количеством тромбоцитарных ферментов: цитохром *c*-оксидазы (ЦО) и белка, подобного глутаминсинтетазе (ГСПБ), с одной стороны, и степенью снижения когнитивного функционирования в обследуемых группах, с другой. Активность ЦО в группе МКС, как и в группе БА, достоверно ниже, чем в контрольной группе, и различия между этими тремя группами достоверны (ранговый тест Краскела—Уоллиса: p=0,0001, медианный тест: χ^2=11,6, p=0,003). Эти же тесты показали достоверные различия количества ГСПБ между тремя обследованными группами (p=0,04 и χ^2=9,38, p=0,01 соответственно). Для объединенной группы (МКС и БА) обнаружена статистически значимая обратная корреляция между количеством ГСПБ и показателями шкалы MMSE, т.е. чем ниже показатели по MMSE, тем выше уровень тромбоцитарного ГСПБ. Тромбоцитарные ЦО и ГСПБ, по-видимому, могут претендовать на роль ранних маркеров когнитивных нарушений.

Ключевые слова: *болезнь Альцгеймера, синдром мягкого когнитивного снижения, тромбоцитарные маркеры, цитохром с-оксидаза, подобный глутаминсинтетазе белок.*

The study aimed to develop pre-clinical diagnosis of Alzheimer's disease (AD) and — in future — preventive therapy in patients with mild cognitive impairment (MCI). The MCI group (n=44) and AD group (n=42, including 18 patients with soft dementia and 24 patients with mild dementia) were studied. The groups were matched for age (median 70 and 69 years for MCI and AD groups, respectively). The control group comprised 24 mentally healthy relatives of the patients. Correlations between the activity/amounts of platelet enzymes: cytochrome c-oxidase (COX), glutamine synthetase—like protein (GSLP) and the extent of cognitive impairment were studied. The COX activity in MCI and AD groups was significantly lower than in the control group (Kruskal-Wallis test p=0.0001, χ^2=11.6, p=0.003). These tests showed significant differences in GSLP amount between three groups (p=0.04 and χ^2=9.38, p=0.01, respectively). Significant reverse correlation (Spearman R= –0.43, p=0.007) was found between GSLP amount and MMSE scores for MCI+AD group, i.e., the lower MMSE scores, the higher platelet GSLP level. Platelet COX and GSLP may be considered as early markers of cognitive impairment.

Key words: *Alzheimer's disease, mild cognitive impairment syndrome, platelet markers, cytochrome c-oxidase, glutamine synthetase — like protein.*

Исследование, результаты которого представлены в настоящей работе, проводилось с целью разработки методов доклинической диагностики и превентивной терапии болезни Альцгеймера (БА) у лиц с синдромом мягкого когнитивного снижения (Mild Cognitive Impairment — MCI; МКС).

МКС следует рассматривать как состояние когнитивного функционирования, а не самостоятельное заболевание [33]. Синдром МКС может быть обусловлен различными заболеваниями ЦНС (включая психические), при этом специфические особенности (так называемые паттерны) разных типов синдрома МКС различны. В связи с гетерогенностью синдрома и различной вероятностью дальнейшего снижения когнитивных функций вплоть до деменции при разных формах МКС поиск биологических маркеров этого синдрома в основном проводится по нескольким условно выделенным направлениям [6]: 1 — специфические невропатологические маркеры БА [30];

© Коллектив авторов, 2012

*e-mail: boksha_irina@mail.ru

Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 2012;112:2:55

2 — неспецифические маркеры нейродегенерации [18]; 3 — маркеры окислительного стресса [32]; 4 — маркеры воспаления нервной ткани [21].

Гетерогенность синдрома МКС обусловлена несколькими причинами. Синдром возникает на различном генетическом фоне, при этом вклад эпигенетической регуляции в его развитие до конца не ясен [12, 29]. Вместе с тем существуют доказательства возможности эпигенетической регуляции активности и содержания ферментов деградации амилоидного пептида [5, 7, 27]. Нарушение такой регуляции приводит к проблемам в реализации когнитивных функций и развитию МКС. Однако на стадии МКС возможно восстановление нормального физиологического уровня активности ферментов метаболизма амилоидного пептида. Поэтому раннее выявление развития МКС является ключевым звеном в профилактике и терапии нейродегенеративных болезней.

МКС в основном характеризуется нестабильным состоянием пациентов: у них есть высокий риск развития деменции (примерно в 90% случаев это деменция альцгеймеровского типа (БА)). Поскольку МКС может служить указанием на то, что у пациента в будущем разовьется БА или другой тип деменции (связанный с нейродегенеративными процессами), синдрому МКС уделяется большое внимание и разработаны критерии определения типов этого синдрома [3, 4, 13, 14]. Благодаря клинико-генетическим исследованиям удалось выделить набор признаков, которые позволяют оценить степень риска БА у пациентов с МКС [4, 16, 33], однако исследования, направленные на повышение достоверности таких прогнозов, продолжаются.

В первую очередь представляет интерес раннее обнаружение связанных с МКС биохимических изменений (так называемых биохимических маркеров синдрома МКС), а также выявление среди пациентов с МКС, прошедших обследование, таких подгрупп, которым угрожает риск развития деменции (т.е. поиск преклинических маркеров деменции альцгеймеровского типа) [19, 29].

Большое значение имеет безопасность и доступность методов обследования пациентов с МКС (на доклинической стадии БА). В большинстве западных стран производится взятие образцов цереброспинальной жидкости, и именно на таких образцах исследуют в основном биохимические маркеры БА [8, 19, 24, 25]. Процедура взятия крови из локтевой вены безопаснее, менее травмирующая и общепринятая в российских медицинских учреждениях, поэтому в представленном исследовании поиск биохимических маркеров проводили на тромбоцитах венозной крови, взятой из локтевой вены.

В предшествующих работах было обнаружено достоверное снижение активности тромбоцитарного митохондриального дыхательного комплекса IV — цитохром *c*-оксидазы (ЦО) у группы пациентов с синдромом МКС — по сравнению с контрольной группой, причем по ЦО-активности группа пациентов с МКС занимала промежуточное положение между контролем и группой больных БА [1]. Также на ограниченной группе пациентов были получены данные о достоверно повышенном количестве тромбоцитарного белка, подобного глутаминсинтетазе (ГСПБ), в группах с МКС и БА по сравнению с контролем [1, 9].

Следуя систематизации поисков биологических маркеров МКС, приведенной в упоминавшейся выше работе [6], изучение тромбоцитарных ЦО и ГСПБ можно отнести к направлению поиска неспецифических маркеров нейродегенерации, поскольку снижение энергетического метаболизма и повышение уровня тромбоцитарных метаболизирующих глутамат ферментов, характерные для БА, не специфичны для этого заболевания, а обнаружены также и при шизофрении [2, 10].

Рабочая гипотеза настоящего исследования заключалась в предположении, что существует взаимосвязь между активностью ЦО и количеством белка, подобного глутаминсинтетазе (ГСПБ), и степенью снижения когнитивного функционирования в обследуемых группах.

Цель работы — изучение активности цитохром *c*-оксидазы и количества подобного глутаминсинтетазе белка в тромбоцитах при синдроме МКС.

Материал и методы

Группа пациентов с МКС, диагностированного в соответствии с операциональными критериями, разработанными группой авторов из исследовательского центра по деменции Нью-Йоркского университета и их коллегами из Лондонского института неврологии [17], включала 44 человека — 14 мужчин и 30 женщин в возрасте от 48 до 85 лет (медиана — 70 лет). Группа больных БА, диагностированной в соответствии с критериями NINCDS-ADRDA [23], включала 42 человека — 16 мужчин и 26 женщин в возрасте от 55 до 84 лет (медиана — 69 лет).

Все пациенты были обследованы в Отделе по изучению болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней расстройств НЦПЗ РАМН (руководитель отдела — проф. С.И. Гаврилова). В процессе обследования использовались оценочные шкалы: MMSE [15], ADAScog [31] и CDR [26].

Контрольную группу составили 24 человека (только женщины) психические здоровые некровные родственники больных БА и пациентов с МКС.

Пациенты с МКС эпизодически получали препараты, рекомендованные специалистами-гериатрами, в соответствии с индивидуальным состоянием (танакан, сермион, кавинтон, церебролизин, вазобрал, цитиколин, токоферол, ноопепт, винпоцетин, ренитек).

Группа больных БА состояла из 18 больных с мягкой деменцией (из них 10 — с сенильным и 8 — с пресенильным типом) и 24 больных с умеренной деменцией (6 — с сенильным и 18 — с пресенильным типом). Больные получали различные виды терапии, рекомендованные для лечения БА: акатинол мемантин, экселон (ривастигмин), реминил (галантамин).

У всех обследованных были взяты образцы крови для биохимических анализов — определения ферментативной активности ЦО и количества ГСПБ.

Активность ЦО была определена у всех обследованных лиц, а количество тромбоцитарного ГСПБ — у 20 пациентов с МКС, 18 больных БА и в контрольной группе.

Из образцов крови (10 мл), взятой из локтевой вены с цитратным буфером, выделялись тромбоциты. Митохондриальная фракция тромбоцитов обрабатывалась детергентом (n-додецил-β-D-мальтозидом) для растворения ЦО (митохондриального фермента) без потери активности, затем спектрофотометрическим кинетическим методом определялась ферментативная активность ЦО (цитохром *c* восстанавливался дитионитом натрия) [11, 28].

Количество ГСПБ определялось фермент-сопряженным вестерн-иммуноблоттингом с хемилюминесцентным усилением сигнала, как подробно описано ранее [1].

Статистический анализ по тесту Краскела—Уоллиса (Kruskal—Wallis ANOVA) — ранговый (by Ranks), медианный (Median test), U-тест Манна—Уитни (Mann—Whitney U-test) и поиск ранговых корреляций Спирмена (коэффициент корреляции Spearman R) — проводился с помощью программы Statistica 6.0, модуль «непараметрический анализ».

Результаты и обсуждение

Как можно было видеть из состава групп обследованных, они различались по числу представителей разных полов, но достоверно не различались по возрасту (тест Краскела—Уоллиса).

Дальнейший поиск различий между подгруппами непараметрическими методами сравнения показал, что тромбоцитарная ЦО-активность в группе пациентов с МКС, как и в группе БА, достоверно ниже, чем в контроле (рис. 1), и различия между этими тремя группами достоверны: ранговый тест Краскела—Уоллиса, p=0,0001, медианный тест χ^2=11,6, p=0,003.

Анализ частотного распределения активности ЦО в группе пациентов с МКС (рис. 2) обнаружил присутствие двух пиков. Это, возможно, отражает гетерогенность группы (однако связи этого разделения на высокие и низкие значения активности ЦО с какими-либо другими данными о пациентах группы МКС не обнаружено). Для выяснения причин наличия двух максимумов активности ЦО в обследованной выборке необходимо по-видимому, определение дополнительных клинических параметров.

По уровням активности ЦО среди пациентов с МКС можно выделить подгруппу в 20 пациентов (из 44), у которых активность ЦО ниже минимальных контрольных значений и находится в пределах разброса значений, определенных для группы больных БА. Относительно пониженная активность ЦО не обусловлена различиями в индивидуальной терапии пациентов с МКС (анализ зависимости активности ЦО от вида препарата каких-либо достоверных связей не показал). У пациентов этой подгруппы предлагается проводить дальнейшие оценки когнитивного функционирования и проследить его возможные изменения.

Отметим, что гетерогенность синдрома МКС не только создает трудности при поиске одиночных биомаркеров в крови, которые помогли бы прогнозировать развитие МКС в деменцию, но и, вероятно, может служить объяснением разногласий в опубликованных результатах исследований потенциальных диагностических биомаркеров. Так, одни авторы сообщают о достоверно повышенной концентрации киназы-3-гликогенсинтазы (GSK3) в лимфоцитах периферической крови больных БА и пациентов с МКС [20], а другие — наоборот, о достоверно сниженном уровне этого фермента в мононуклеарах больных БА [22].

На современном этапе поиск биомаркеров должен основываться на системном анализе, и лишь сочетание нескольких параметров может иметь индивидуальное диагностическое и прогностическое значение — как для больных БА [19], так и пациентов с различными когнитивными расстройствами, включая МКС и психические заболевания [9].

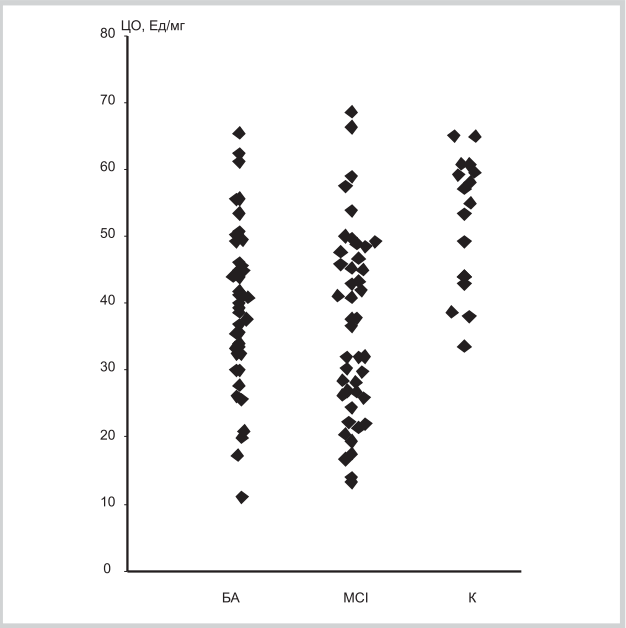

Рис. 1. **Активность тромбоцитарной ЦО у пациентов с БА, синдромом МКС и в контрольной группе (К).**

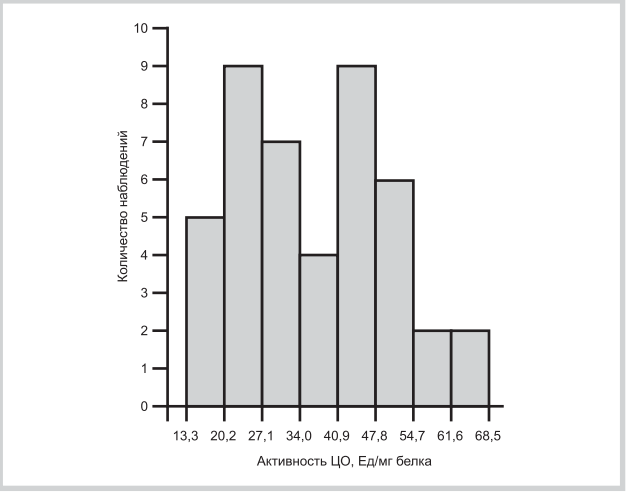

Рис. 2. **Распределение пациентов с МКС по активности тромбоцитарной ЦО.**

Что касается количества ГСПБ, оно было определено у 20 пациентов с МКС, 18 больных с БА и всех лиц контрольной группы. Ранговый тест Краскела—Уоллиса и медианный тест показали достоверные различия количества ГСПБ между тремя обследованными группами (p=0,04 и χ^2=9,38, p=0,01 соответственно).

Для объединенной группы МКС и больных с БА (38 человек) поиск связей (непараметрический анализ — ранговые корреляции — определение коэффициентов Спирмена) между биохимическими признаками и данными нейрокогнитивного тестирования по MMSE показал наличие статистически значимой обратной корреляции между количеством ГСПБ и MMSE: Spearman R=–0,43, p=0,007 (т.е. чем ниже результаты тестирования по MMSE, тем выше уровень тромбоцитарного ГСПБ).

Зависимость количества ГСПБ от пола была обнаружена только в группе пациентов с МКС (количество ГСПБ достоверно различалось у мужчин и женщин: U-тест Манна—Уитни p=0,03). У больных с БА такой зависимости не обнаружено.

Поскольку динамика (изменения за 2 года) когнитивного функционирования (по показателям MMSE) прослежена только у 10 представителей группы пациентов с МКС, в настоящий момент еще рано говорить о прогностической значимости исследованных биохимических признаков. Однако эти признаки, по-видимому, могут претендовать на роль ранних маркеров когнитивных нарушений, на что указывает как связь количества ГСПБ с результатами шкалы MMSE, так и обнаруженные достоверные различия обоих биохимических признаков между обследованными группами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурбаева Г.Ш., Бокша И.С., Турищева М.С. и др.* Тромбоцитарные цитохром *c*-оксидаза и белок, подобный глутаминсинтетазе, как кандидаты на роль ранних маркеров болезни Альцгеймера. Психиатрия 2008; 4—6: 29—33.
2. *Бурбаева Г.Ш., Бокша И.С., Каледа В.Г. и др.* Белок, подобный глутаминсинтетазе, глутаматдегидрогеназа и цитохром *c*-оксидаза в тромбоцитах больных при первом психотическом приступе в связи с лечением. Журн неврол и психиат 2011; 111: 9: 61—66.
3. *Гаврилова С. И., Федорова Я. Б., Рощина И. Ф. и др*. Прогноз синдрома мягкого когнитивного снижения по данным двухлетнего клинико-катамнестического исследования. Журн неврол и психиат 2007; 107: 1: 107: 4—10.
4. *Гаврилова С.И.* Возможности доклинической диагностики и превентивного терапевтического вмешательства при болезни Альцгеймера. Психиатрия 2009; 1: 37: 18—29.
5. *Журавин И.А., Дубровская Н.М., Васильев Д.С и др*. Эпигенетическая и фармакологическая регуляция амилоид-деградирующего фермента неприлизина приводит к изменению когнитивных функций млекопитающих. ДАН 2011; 438: 6: 838—841.
6. *Bailey P.* Biological Markers in Alzheimer's Disease. Can J Neurol Sci 2007; 34: Suppl 1: 72—76.
7. *Belayev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z. et al.* Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rept 2009; 10: 1: 94—100.
8. *Blasko I., Lederer W., Oberbauer H. et al*. Measurement of thirteen biological markers in csf of patients with Alzheimer's disease and other dementias. Dement Geriatr Cogn Disord 2006; 21: 1: 9—15.
9. *Boksha I., Burbaeva G., Savushkina O. et al*. Blood proteins as markers and predictors of cognitive deficit in mental pathologies. 3-th World Congress Gene-2009. Foshan, China, Abstracts. http://www.bitlifesciences.com/wcg2009/Program.asp
10. *Burbaeva G.Sh., Boksha I.S., Turishcheva M.S. et al.* Platelet cytochrome *c*-oxidase activity in patients with acute schizophrenia in the course of their treatment with risperidone. Health 2011; 3: 1: 13—19.
11. *Cardoso S.M., Proença M.T., Santos S. et al*. Cytochrome *c* oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. Neurobiol Aging 2004; 25: 1: 105—110.
12. *Chouliaras L., Rutten B.P.F., Kenis G. et al*. Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Prog Neurobiol 2010; 90: 4: 498—510.
13. *DeCarli C.* Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. Lancet Neurol 2003; 2: 1: 15—21.
14. *Dubois B, and Albert M.L.* Amnestic MCI or prodromal Alzheimer's disease? Lancet Neurol 2004; 3: 4: 246—248.
15. *Folstein M.F., Folstein S. E, McHugh P.R.* Mini-Mental State. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatric Res 1975; 2: 189—198.
16. *Gavrilova S.I., Fedorova Y.B., Roshchina I.F. et al.* Prognosis of mild cognitive impairment syndrome: data from a two-year clinical follow-up study. Neurosci Behav Physiol 2008; 38: 2:129—134.
17. *Golomb J., Kluger A., Garrard P., Ferris S.* Clinician's manual on mild cognitive impairment. Science Press Ltd., London 2001; 56.
18. *Harry J., Tilson H.A.* Neurodegeneration methods and protocols. Humana Press (Totowa, N.J.) 1999; 74.
19. *Humpel C.* Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. Trends Biotechnol 2011; 29: 1: 26—32.
20. *Hye A., Kerr F., Archer N. et al.* Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 2005; 373: 1: 1—4.
21. *Kim S.M., Song J., Kim S. et al*. Identification of peripheral inflammatory markers between normal control and Alzheimer's disease. BMC Neurol 2011; 12: 11: 51.
22. *Marksteiner J. and Humpel C.* Glycogen-synthase kinase-3beta is decreased in peripheral blood mononuclear cells of patients with mild cognitive impairment. Exp Gerontol 2009; 44: 6—7: 370—371.
23. *McKhann G., Drachman D., Folstein et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS/ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. Neurology 1984; 34: 939—944.
24. *Mattsson N., Zetterberg H., Hansson O. et al.* CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. JAMA 2009; 302: 4: 385—393.
25. *Monge-Argilés J.A., Muñoz-Ruiz C., Pampliega-Pérez A. et al.* Biomarkers of Alzheimer's disease in the cerebrospinal fluid of Spanish patients with mild cognitive impairment. Neurochem Res 2011; 36: 6: 986—993.
26. *Morris J.C.* Clinical Dementia Rating: A Reliable and Valid Diagnostic and Staging Measure for Dementia of the Alzheimer Type. Int Psychogeriatr 1997; 8: 173—176.
27. *Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T. et al.* Presenilin-dependent transcriptional control of the Aβ-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of βAPP and APLP. Neuron 2005; 46: 541—554.
28. *Parker W.D. Jr., Parks J.K.* Cytochrome *c* oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization. Neurology 1995; 45: 3: Pt 1: 482—486.
29. *Pater C.* Mild Cognitive Impairment (MCI) — The novel trend of targeting Alzheimer's disease in its early stages — methodological considerations. Curr Alzheimer Res 2011; 18.
30. *Rolstad S., Berg A.I., Bjerke M. et al.* Amyloid-β42 is associated with cognitive impairment in healthy elderly and subjective cognitive impairment. J Alzheimers Dis 2011; 26: 1: 135—142.
31. *Rosen W.C., Mohs K.C., Davis K.Z.* A new rating scale for Alzheimer's disease. Am J Psychiatry 1984; 141: 1356—1364.
32. *Torres L.L., Quaglio N.B., de Souza G.T. et al.* Peripheral oxidative stress biomarkers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 2011; 26: 1: 59—68.
33. *Visser P.J.* Ten-year risk of dementia in subjects with mild cognitive impairment. Neurology 2006; 67: 1201—1207.