

УДК 616.12-018.74-008.6:616.831-005:577.115

**І.І. Кричун**

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

**Ключові слова:** ендотеліальна дисфункція, апоптоз, енцефалопатія, глутаргін.

**ЗМІНИ КОНЦЕНТРАЦІЇ В ПЛАЗМІ КРОВІ МАРКЕРІВ АПОПТОЗУ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ГІПЕРТОНІЧНУ ДИСЦИРКУЛЯТОРНУ ЕНЦЕФАЛОПАТІЮ ТА МЕТОДИ ЇХ КОРЕКЦІЇ**

**Резюме.** Вивчена концентрація в плазмі крові sCD95, sFasL, sCD117 та активність каспаз-1, -3, -8 у хворих на гіпертонічну дисциркуляторну енцефалопатію I стадії. Показано зростання апоптичної активності у обстежених хворих та її нормалізація при курсовому лікуванні глутаргіном.

**Вступ**

Проблема цереброваскулярних захворювань в Україні та світі є однією з найактуальніших у сучасній клінічній медицині в зв'язку зі значною частотою їх розвитку, великим відсотком інвалідизації та смертності [1]. Хронічні форми становлять близько 90% випадків у структурі цереброваскулярних захворювань. Ці аспекти визначають актуальність і пріоритетність вивчення проблеми судинних захворювань головного мозку. Найактуальнішими з них є питання вивчення різноманітних механізмів, що призводять до розвитку дисциркуляторної енцефалопатії, а також шляхи їх корекції.

За сучасними уявленнями, апоптоз є не тільки фізіологічним процесом, який регулює об'єм клітинної маси та її форму в організмі, що розвивається, але за певних умов включається в механізми патогенезу багатьох захворювань, пов'язаних із порушенням клітинного поділу [3]. Не виключено, що в патогенезі гіпертонічної дисциркуляторної енцефалопатії (ГДЕ) певну роль також відіграють порушення апоптозу, зокрема на рівні ендотеліальних клітин.

**Мета дослідження**

Дослідити зміни концентрації в плазмі крові показників апоптозу, таких як sCD95, sFasL, sCD117 і активність каспаз-1, -3, -8 у хворих на гіпертонічну дисциркуляторну енцефалопатію I стадії та виявити зміни цих показників під впливом курсового лікування з використанням глутаргіну.

**Матеріал і методи**

Проведено обстеження 24 хворих на ГДЕ I стадії та 15 практично здорових осіб, які не відрізнялись за віком від групи обстежених хворих. Дослідження здійснювалися у відповідності до основних положень GCP (1996 р.), Конвенції ради Європи про права людини та біомедицину від 04.04.1997 р. та Гельсінської декларації Всес-

вітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2000 р.) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р..

Середній вік обстежених хворих склав 45,3±7,59 року. Хворі знаходилися на лікуванні у неврологічних відділеннях поліклінік м. Чернівці.

У всіх хворих вивчався клініко-неврологічний стан, проводились загальноприйняті лабораторні обстеження, рутинні інструментальні методи обстеження: ЕКГ, РЕГ, транскраніальна УЗДГ, ЕхоЕС, ЕЕГ, КТ.

У роботі використовували набори реактивів для імуноферментного визначення sCD95, sFasL і sCD117 (Diaclone Res., Франція) та біохімічного дослідження активності каспаз-1, -3, -8 (Bio Vision, США) з реєстрацією на рідері "Уніплан-М" (Росія).

Кров для імуноферментних та біохімічних методів дослідження збирали з ліктьової вени вранці, натщесерце до лікування (на 1-3 добу госпіталізації) і після проведеної терапії (на 14-15 добу).

Усім обстеженим хворим на ГДЕ провели дослідження вмісту в плазмі крові перерахованих показників апоптозу ендотеліоцитів у динаміці до та після лікування з використанням глутаргіну 0,75 - по 1 таблетці 3 рази на день. Курс лікування хворих становив 15 днів.

Статистична обробка матеріалів дослідження виконувалася диференційовано залежно від типу вихідних даних: для парних досліджень в динаміці процесу був використаний парний критерій Ст'юдента, для показників, виражених у долях одиниці або процентах - використовувалося кутове Фішерівське перетворення Фішера. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми "BioStat" та програми Excel з пакету програм Microsoft Office 2007.

**Обговорення результатів дослідження**

Аналіз перебігу та клінічної симптоматики ГДЕ I стадії продемонстрував наступне. У всіх

обстежених пацієнтів були наявні чіткі ознаки судинної недостатності дифузного або регіонарного типу. Вона проявлялася прогресуючим зниженням пам'яті (у т.ч. професійної) (79,31% осіб), зниженням працездатності, ослабленням функціональної активності. Типовою ознакою був поганий нічний сон (84,48%) при сонливості вдень. Поряд із розсіяною мікроорганічною симптоматикою з'являлися симптоми, що свідчили про розлади функцій лобних часток мозку, підкіркових вузлів і мозкового стовбура. Під час обстеження виявляли рефлекс Марінеску-Радовича (89,65%), ротовий рефлекс Бехтерева (77,58%). З'являвся хапальний рефлекс (20,68%), асиметрія черепної іннервації (18,96%), дизартрія. Значно підвищувалися глибокі рефлекси з розширенням рефлексогенних зон, нерідко вони були асиметричні. Поряд із недостатністю пірамідної системи розвивалася й екстрапірамідна недостатність: невідповідність мімічних реакцій, брадикінезія, тремор пальців кисті (24,13%). Мали місце порушення м'язового тону у вигляді пластичної гіпертонії (35%). З'являлися ознаки ураження мозочка і

стовбурових відділів головного мозку: вестибулярні, координаційні, атактичні розлади. Часто виникали вегетативно-судинні пароксизми (81,03%).

Яскраво вираженим у всіх хворих був цефалгічний синдром з переважною локалізацією болю у потиличних ділянках. У більшості пацієнтів головний біль традиційно виникав вночі і проявлявся відчуттям тяжкості в ділянці потилиці, яка проходила при активному включенні хворого у трудовий процес, що, можливо, пояснюється утрудненням венозного відтоку з порожнини черепа. Підсилення головного болю у вигляді пароксизмів виникали, зазвичай, під час підвищення артеріального тиску.

Результати дослідження маркерів апоптозу ендотеліоцитів, розчинного фактора стовбурових клітин (sCD117) та активності каспаз в обстежених хворих наведені в таблиці.

Як свідчать дані таблиці у хворих на ГДЕ в плазмі крові на 22% зменшується вміст sCD95 і на 44% збільшується рівень sCD117, що супроводжується підвищенням активності каспази-1,

Таблиця

**Вплив лікування з використанням глутаргіну на концентрацію в плазмі крові розчинних форм рецепторів фактора стовбурових клітин, чинників апоптозу і активність каспаз у хворих на гіпертонічну дисциркуляторну енцефалопатію 1 стадії (x±Sx)**

Групи хворих	sCD95, пг/мл	sFasL, пг/мл	Каспаза-1, од./мл	Каспаза-3, од./мл	Каспаза-8, од./мл	sCD117, нг/100 мкл
Контроль (практично здорові волонтери), n=15	117,50±10,09	209,40±16,28	0,049±0,004	0,080±0,007	0,102±0,008	2,35±0,32
Хворі на ГДЕ до лікування, n=18, <b>1 група</b>	91,61±6,68 p<0,05	188,10±8,71 p>0,2	0,077±0,007 p<0,01	0,098±0,009 p>0,1	0,139±0,016 p>0,06	3,38±0,33 p<0,05
Хворі на ГДЕ після лікування, n=9, <b>2 група</b>	84,20±8,85 p<0,05 p1-2>0,5	178,10±13,20 p>0,1 p1-2>0,5	0,062±0,006 p>0,07 p1-2>0,1	0,096±0,007 p>0,1 p1-2>0,8	0,116±0,014 p>0,3 p1-2>0,3	2,93±0,38 p>0,2 p1-2>0,4

Примітки: p -- ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; p1-2, -- ступінь достовірності різниць показників до та після лікування; n -- число спостережень

однак активність каспаз-3 і -8, а також вміст у крові sFas-L не змінюються. Лікування з використанням глутаргіну зменшує плазмовий вміст sCD95 на 28%, нормалізує рівень у крові sCD117 і не впливає на концентрацію sFas-L і активність каспаз-1, -3, -8 у плазмі крові.

Відомо, що в передачі сигналу до розвитку апоптозу приймає участь Fas-рецептор (CD95,

АРО-1), локалізований на клітинах різних типів, у тому числі і на ендотеліоцитах [5]. Природнім лігандом CD95 і джерелом сигналізації, яка призводить до розвитку апоптозу, є Fas-ліганд (Fas-L) [4]. У випадку Fas-залежного апоптозу зв'язування Fas-ліганду з тримерним Fas-рецептором призводить до конформаційних змін у цитоплазматичному домені смерті Fas-рецептора, що дає

можливість його зв'язування з аналогічним доменом адапторної молекули FADD (Fas-associated death domain), а потім - з таким самим доменом білка RIP (Receptor interacting protein). Комплекс, що утворюється при цьому активує протеазу FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme), що призводить до включення загального шляху розвитку апоптозу [6]. У реалізації апоптозу приймають участь ряд транскрипційних факторів, які відповідають за активацію клітин (тобто за їх вихід із фази спокою та залучення до циклу) або рух по циклу. До них перш за все відносять фактори Nur-77 і c-myc. Експресія c-myc в умовах неповноти ростового сигналу призводить до експресії активатора цикліна залежних кіназ - фосфатази cdc 25A. Передчасна експресія останніх у клітинах, не захищених від реалізації програми загибелі клітини, призводить до входу клітини у цикл автоматичного розвитку апоптозу [7]. Реалізація апоптозу детермінована двома генами - sed-3 та sed-4. У ссавців продукти sed-3 ідентифіковані як цистеїнова протеаза та її гомологи які водночас володіють активністю серинових протеаз і складають родину ферментів, названих каспазами. З активацією каспаз пов'язаний масовий протеоліз цитоплазматичних білків при розвитку апоптозу, однак безпосереднє відношення до загибелі клітин через апоптоз мають ядерні мішені каспаз. Інактивація каспаз у результаті мутації генів або дії вірусних білків (наприклад, білка p35 або білка CrmA) запобігає розвитку апоптозу [8].

Отже, апоптоз уявляє собою складний комплекс генетично детермінованих реакцій, порушення будь-якої ланки котрого здатне призвести до розвитку патологічного процесу, пов'язаного зі змінами спеціалізованої клітинної маси у той чи іншій бік. За результатами нашого дослідження, у хворих на ГДЕ виявлені зміни ініціальних і ефекторних механізмів Fas-залежного апоптозу, що може свідчити про певну патогенетичну роль порушень апоптозу при цьому захворюванні, оскільки різке зростання вмісту в крові проапоптозних чинників sCD95 і sFas-L не тільки супроводжується значним збільшенням активності каспаз-1, -3 і -8, але й відбувається на тлі суттєвого підвищення плазмової концентрації sCD117 - фактора, який захищає стовбурові клітини від загибелі через апоптоз [2].

### Висновки

У хворих на ГДЕ 1-ї стадії на ендотеліальному рівні різко зростає інтенсивність як поділу клітин, так й їхнього апоптозу - процес, що призводить до неконтрольованого і незбалансованого виділення

біологічного активних речовин ендотелію, які володіють потужним і функціонально антагоністичним впливом на тонус судин резистивного типу.

Використання в лікуванні глутаргіну у даної категорії пацієнтів практично усуває встановлені зміни вмісту в плазмі крові чинників апоптозу I типу і активності каспаз-1, -3, -8.

### Перспективи подальших досліджень

Таким чином, є необхідність подальшого вивчення ролі апоптозу ендотеліоцитів у патогенезі розвитку ГДЕ та дослідження впливу лікарських препаратів на ці процеси для розробки патогенетично обґрунтованої терапії та профілактики розвитку судинних катастроф на ґрунті ГДЕ.

**Література.** 1.Гайдаєв Ю.О. Стан здоров'я населення України та забезпечення надання медичної допомоги. Аналітично-статистичний посібник / Ю.О. Гайдаєв, В.М. Коваленко, В.М. Корнацький. - Київ, 2007. - 97 с. 2.Кухарчук О.Л. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на динаміку системного артеріального тиску у спонтанно гіпертензивних шурів / О.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, В.М. Сірман [та ін.] // Фізіологічний журнал. - 2003. - Т. 49, № 4. - С.68-71. 3.Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). - М.: Медицина, 2001. - 192 с. 4.Feng G. Induction of Fas receptor and Fas ligand by nodularin is mediated by NF- $\kappa$ B in HepG2 cells / G. Feng, Y. Li, Y. Bai // Toxicol Appl Pharmacol. - 2011. - № 251(3). - P. 245-52. 5.Fortner K.A. Fas (CD95/APO-1) limits the expansion of T lymphocytes in an environment of limited T-cell antigen receptor/MHC contacts / K.A. Fortner, R.K. Lees, H.R. MacDonald [et al.] // Int Immunol. - 2011. - № 23(2). - P. 75-88. 6.Morales J.C. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF-kappaB inhibition / J.C. Morales, M.J. Ruiz-Magaña, C. Ruiz-Ruiz // Mol Immunol. - 2007. - № 44(10). - P. 2587-97. 7.Rangelova S. FADD and the NF-kappaB family member Bcl-3 regulate complementary pathways to control T-cell survival and proliferation / S. Rangelova, S. Kirschnek, A. Strasser [et al.] // Immunology. - 2008. - № 125(4). - P. 549-57. 8.Siegmund D. Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells / D. Siegmund, S. Klose, D. Zhou [et al.] // Cell Signal. - 2007. - № 19(6). - P. 1172-84.

### ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ И МЕТОДЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

*И.И. Кричун*

**Резюме.** Изучена концентрация в плазме крови sCD95, sFasL, sCD117 и активность каспаз-1, -3, -8 у больных гипертонической дисциркуляторной энцефалопатией I стадии. Показано возрастание апоптотической активности у обследованных больных и ее нормализация при курсовом лечении глутаргином.

**Ключевые слова:** эндотелиальная дисфункция, апоптоз, энцефалопатия, глутаргин.

### CONCENTRATION CHANGES OF APOPTOSIS MARKERS OF ENDOTHELIOCYTES IN THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS SUFFERING FROM HYPERTENSIVE DYSIRCULATORY ENCEPHALOPATHY AND METHODS OF ITS CORRECTION.

*I.I. Krychun*

**Abstract.** Objective: Concentration of molecules sCD95, sFas-L, sCD117 and activity of caspas-1,-3,-8 in the blood plasma before and after the course of taking Glutargin preparation containing arginine in patients with hypertensive dyscirculatory encephalopathy stage1.

**Methods.** 24 patients suffering from hypertensive dyscirculatory encephalopathy stage 1 have been examined. The average age of the patients under study constituted  $45,3 \pm 7,59$  years old. The results were compared with analogous indices of 15 practically healthy persons comparable as to the age and sex with patients under study.

**Results:** sCD95 content decreases 22% and sCD117 level increases 44% in the blood plasma accompanied by an increase of activity of kaspaz-1 in the group of patients under observation in comparison with the group of control. Hereby, the activity of kaspaz-3, and -8, sFas-L content in the blood do not change.

Treatment of patients using glutargine decreases sCD95 plasma content 28% normalizes sCD117 level in the blood and doesn't influence upon concentration sFas-L and activity of

kaspaz-1,-3,-8 in the blood plasma.

**Conclusions:** The results of the research showed, that the intensity of both cell division and their apoptosis had been sharply increasing on endothelial level since the first stage of hypertensive dyscirculatory encephalopathy

Glutargin usage in patients suffering from hypertensive dyscirculatory encephalopathy practically eliminates the determined factors of apoptosis stage1 and activity of kaspaz-1,-3,-8 in the blood plasma that pathogenetically substantiates the expediency of the use of preparations containing arginin in case of cerebrovascular diseases.

**Key words:** endothelial dysfunction, apoptosis, encephalopathy, glutargin.

**Higher State Educational Establishment of Ukraine  
"Bukovinian State Medical University", Chernivtsi**

*Clin. and experim. pathol.* - 2015. - Vol.14, №4 (54). - P.74-77.

*Надійшла до редакції 27.11.2015*

*Рецензент – проф.І.Й. Сидорчук*

*© І.І.Кричун, 2015*