УДК 616.831-092.18:616.839.6-06:616.12-008.331.4

ІНДИВІДУАЛЬНА ДІАГНОСТИКА СИРОВАТКОВИХ ЦИТОТОКСИЧНИХ ЧИННИКІВ У ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПОТОНІЮ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ БІОСЕНСОРНОЇ ІНДИКАЦІЇ

Доц. О. К. Зінченко

Харківська медична академія післядипломної освіти

Артеріальна гіпотонія — це проблема, до складу якої входить багатогранність клінічних, функціональних і соціально-психологічних проявів. Тому питанню патогенезу, діагностики та підбору індивідуальної терапії приділяється велика увага. Запропонований метод скринінг-діагностики дає змогу розв'язати основні питання, пов'язані з оцінкою всієї сукупності потенційно цитотоксичних сироваткових чинників хворих на артеріальну гіпотонію в групі з вегетативною дисфункцією, та підібрати індивідуальну тактику лікування з урахуванням взаємодії рекомендованих традиційно фармпрепаратів із сироваткою крові хворого на артеріальну гіпотонію з використанням біосенсорної індикації за допомогою клітинного біосенсору Dunaliella viridis у системі in vitro.

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПОТОНИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРНОЙ ИНДИКАЦИИ

Доц. Е. К. Зинченко

Артериальная гипотония — это проблема, в состав которой входит многогранность клинических, функциональных и социально-психологических проявлений. Поэтому вопросам патогенеза, диагностики и подбора индивидуальной терапии уделяется большое внимание. Предложенный метод скрининг-диагностики позволяет решить основные вопросы, связанные с оценкой всей совокупности потенциально цитотоксических сывороточных факторов больных артериальной гипотонией в группе с вегетативной дисфункцией, и подобрать индивидуальную тактику лечения с учетом взаимодействия традиционно применяемых для лечения данной патологии фармпрепаратов с сывороткой крови больного артериальной гипотонией с использованием биосенсорной индикации с помощью клеточного биосенсора Dunaliella viridis в системе in vitro.

INDIVIDUAL DIAGNOSTICS OF SERUM CYTOTOXIC FACTORS OF PATIENTS WITH ARTERIAL HYPOTONIA WITH USE OF BIOSENSORY INDICATION

E. K. Zinchenko

Arterial hypotonia is a problem, which structure includes many-sided nature of clinical, functional and social and psychological manifestations. Therefore the great attention allots to questions of pathogenesy, diagnostics and a choice of individual therapy. The offered method of screening diagnostics allows to solve the main questions connected with an assessment of all set of potentially serum cytotoxic factors of patients, diseased on Arterial hypotonia in group from vegetative dysfunction and selection of individual tactics of treatment. Interaction of recommended remedies with serum of blood of the patient, diseased on Arterial hypotonia with using of biosensory indication by means of a cellular biosensor of Dunaliella viridis in in vitro system took into account.

Дотепер нагромаджено достатньо наукових даних, що розкривають багатогранність клінічних, функціональних і соціально-психологічних проявів артеріальної гіпотонії (АГ). Проте основна частина досліджень у галузі вивчення судинної патології останнім часом присвячена визначенню ролі атеросклерозу і гіпертонічної хвороби в структурі цереброваскулярної

патології [3]. Значно менше уваги приділяється питанню артеріальної гіпотонії. Цю обставину багато в чому можна пояснити тим, що в низці випадків виникають складнощі під час диференціювання фізіологічної і патологічної гіпотонії, а також первинної і вторинної, тобто симптоматичної. Крім того, є немало спостережень, які свідчать про те, що артеріальна гіпотонія відрізняється поліморфізмом клінічних проявів і, супроводжуючись зниженням фізичної і розумової працездатності, призводить до розвитку синдрому середовищно дезадаптації й зниження якості життя [6].

Клінічні спостереження за хворими на АГ, наявної в складі неврологічних симптомокомплексів, засвідчили, що ця патологія найчастішою є у вікових групах від 18 до 40–46 років, причому в жінок приблизно в 2 рази частіше, ніж у чоловіків. Поширеність серед дорослого населення становить від 4,2 до 32,45 %. Причому, існують деякі особливості поширення серед жінок і чоловіків у певних вікових групах: до 20 років АГ трапляється в жінок у 16,6 %, а в чоловіків — лише у 2,4 % спостережень, у віці від 21 року до 30 років — у 38,5 % і 14,5 %, від 31 року до 40 років — у 18,1 % і 3,9 % відповідно [4, 5, 6], 41–46 років — 4,4 % і 1,9 % відповідно, причому 79 % становлять особи розумової праці [8].

Актуальність цієї проблеми визначається ще й тим фактом, що АГ є дуже частою причиною серцево-судинних розладів серед осіб молодого віку й не запобігає ранньому розвитку атеросклерозу, змінам ліпідного обміну, які можуть бути атерогенного характеру. Більше того, результати спостережень свідчать, що наявність АГ не захищає пацієнтів від виникнення в майбутньому гіпертонічної хвороби [8]. Проте причинно-наслідкові взаємовідносини між попередньою гіпотензією, що розвивається згодом у артеріальну гіпертензію й атеросклероз, і далі перебувають у дослідників «у тіні» інших проблем і пов'язаних із цим кардіоваскулярними захворюваннями.

Складнощі в діагностиці й виборі тактики лікування полягають в тому, що за цієї патології з'єднуються воєдино судинні ураження з ураженнями нервової системи, тому питання патогенезу, клініки й лікування неврогенних судинних синдромів тісно пов'язані з вивченням судинної регуляції, а також з особливостями порушення компенсаторно-адаптаційних реакцій (КАР), які, у свою чергу, залежать від функціонального стану регуляторних систем організму, а саме від координації нейроімуноендокринних взаємодій [1]. Медіатори цих систем єдині і вони можуть чинити як позитивний модулюючий ефект, так і негативну пригнічувальну цитотоксичну дію. Ця взаємодія є основою адаптаційних можливостей організму. Іноді відбувається ослаблення або порушення синергізму нервової й імунної систем під впливом різноманіття зовнішніх несприятливих чинників впливу на центральну нервову систему, що тягне за собою найчастіше непередбачені наслідки, механізм дії яких на організм людини недостатньо вивчено [7]. Крім того, одним із важливих патогенетичних чинників за такої патології є нагромадження різноманітних стресорних білків, які потенційно можуть чинити цитотоксичну дію, у тому числі впливати на вазоконстрикцію й вазодилатацію, а також викликати незворотні зміни судинного ендотелію [2].

Імунокомпетентні клітини, маючи своєрідну органоспецифічність і гетерогенність лімфоцитарних клітин, залежно від їхньої локалізації в різних тканинах, можуть пригнічувати або стимулювати процеси кооперації з клітинами нервової системи, що, у свою чергу, може викликати структурно-функціональні зміни в нервовій системі [11, 12].

Найчастіше, особливо на початкових стадіях захворювання, АГ має асимптомний характер і ми можемо констатувати лише зміни функціонального характеру, що ускладнює раннє виявлення патології й запобігання подальшому розгортанню клінічної картини [4]. Надалі під впливом різних несприятливих чинників (стреси, травми, наявність хронічних вогнищ інфекції в організмі тощо) можуть формуватися різні неврологічні синдроми, які в більшості випадків обтяжують перебіг АГ, і формується вторинна або симптоматична АГ [5, 10].

Велика кількість публікацій свідчить про те, що одна з провідних ролей у патогенезі формування АГ належить порушенню імуногенетичного контролю за кооперацією ланок нейро-імуно-ендокринного комплексу. Гальмівні процеси в корі й інших відділах центральної нервової системи на певних

етапах свого розвитку мають фізіологічний, охоронний характер, але надалі під впливом несприятливих чинників можуть перетворитися в аутоімунні розлади через надмірне нагромадження цитотоксичних чинників і мембранотропну дію, яка викликає альтерацію тканин [9, 13].

За даними літератури, розвиток АГ детермінується як генетичними, так і осередковими чинниками й становить ряд мультифакторних захворювань, у пускових механізмах яких значну роль можуть відігравати зміни імуно-нейро-ендокринних функцій. У сучасній літературі немає достатньо відомостей (деякі з яких украй суперечливі) про етіологію й провідні механізми розвитку цієї патології. Усе це зумовлює необхідність розробки нових діагностичних підходів для адекватної оцінки індивідуальних етіологічних і патогенетичних чинників розвитку АГ. Актуальною також є розробка заходів щодо вибору індивідуальної тактики лікування й оцінки його ефективності.

Мета роботи — оцінка всієї сукупності потенційно цитотоксичних сироваткових чинників хворих на АГ у групі з вегетативною дисфункцією (ВД) та підбір індивідуальної тактики лікування з урахуванням взаємодії рекомендованих фармпрепаратів із сироваткою крові хворого на АГ з використанням біосенсорної індикації за допомогою клітинного біосенсору Dunaliella viridis (D. v.) у системі in vitro.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Предметом аналізу стали матеріали клінічних спостережень з обстеження 60 хворих на АГ в структурі вегетативної дисфункції, що лікувалися в стаціонарі в неврологічних відділеннях Центральної клінічної лікарні «Укрзалізниці» і проходили амбулаторне обстеження на кафедрі невропатології і дитячої неврології ХМАПО. Усі пацієнти у віці від 18 до 35 років, з них 52 хворих — жінки, 8 — чоловіки. Контрольну групу склали 28 людей із фізіологічною артеріальною гіпотонією тієї ж вікової групи.

З метою поліпшення діагностики та підбору індивідуальної терапії було запропоновано спосіб діагностики цитотоксичних чинників за допомогою клітинного біосенсору Dunaliella viridis, який полягає в оцінці реакції одноклітинного організму D. v. реагувати структурно-функціональними змінами на патологічні сироваткові чинники [9].

Біоіндикаційні методи визначення цитотоксичних чинників ґрунтуються на формуванні специфічного відповідного сигналу біологічно чутливою системою, посиленням цього сигналу і простою системою реєстрації. Ураховуючи здатність біоіндикатора давати різноманітні відповідні реакції, за його допомогою можна визначати в біологічних рідинах сумарні цитотоксичні чинники різноманітної природи [5, 9].

Способом сумісної інкубації обсяг досліджуваної сироватки пацієнтів із різними типами АГ визначають ступінь сироваткової цитотоксичності за змінами клітинного біосенсору на підставі його морфологічних та функціональних порушень. У паралельних пробах досліджують зміни цитотоксичних властивостей сироватки крові пацієнта під впливом терапевтичних доз фармпрепаратів, що використовуються для лікування цієї патології, порівнюють ступінь спонтанної цитотоксичності з контролем та зі ступенем цитотоксичності сироватки в присутності різних фармпрепаратів у системі in vitro.

Запропонований спосіб реалізується в кілька етапів. Використовується синхронізована 21-денна культура одноклітинної водорості Dunaliella viridis (D. v.) у концентрації $15{:}10^6$ клітин/1 мол. Клітинну суспензію вносять послідовно в три лунки планшета по 50 мкл тест-системи. У першу додається 50 мкл 0,9% розчину NaCl (контроль), у другу — 50 мкл сироватки крові хворого, у третю лунку вносять 50 мкл розчину фармпрепарату, що відповідає мінімальній терапевтичній дозі. Після 30-хвилинної спільної інкубації клітин D. v. з переліченими розчинами підраховують відсоток клітин зі зміненими морфологічними й функціональними характеристиками й судять про можливу цитотоксичність досліджуваного фармпрепарату за його мембранотропною дією на клітини D. v.

Використання математичної формули дає змогу оцінити інтегральну цитотоксичність у пацієнтів із різними клінічними формами АГ і провести порівняльний аналіз із нативною контрольною культурою D. v.

Коефіцієнт морфологічної цитотоксичності розраховується за формулою:

$$Km - \frac{M_1 - M_0}{n},$$

де M_1 — відсоток клітин зі зміненою формою в дослідженні;
M_0 — відсоток клітин зі зміненою формою в контролі;
n — спонтанний рівень змін ($n = 10$).

Коефіцієнт функціональної цитотоксичності розраховується за формулою:

$$K_f = \frac{F_1 - F_0}{n},$$

де F_1 — відсоток клітин зі зміненими функціональними особливостями в дослідженні;
F_0 — відсоток клітин зі зміненими функціональними особливостями в контролі;
n — спонтанний рівень змін ($n = 10$).

На основі цих даних розраховується коефіцієнт загальної (сумарної) цитотоксичності за формулою:

$$K = \frac{K_m + K_f}{2},$$

де K_m — коефіцієнт морфологічної цитотоксичності;
K_f — коефіцієнт функціональної цитотоксичності.

У цьому разі, якщо відзначаються значення коефіцієнта загальної цитотоксичності понад 1,0, вважають, що в сироватці крові присутні цитотоксичні компоненти. Якщо значення коефіцієнта загальної цитотоксичності не перевищують 1,0, сироватка крові не містить цитотоксичних компонентів.

Статистична обробка здобутих результатів проводилася за допомогою математичних методів із визначенням статистичної значущості достовірності відмінностей порівнюваних величин за допомогою програми Statistika 6.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Було продіагностовано сироватку крові пацієнтів із АГ, з групи хворих із ВД та групи хворих із ВД сумісно з 900 мг (мінімальна терапевтична доза) фармпрепарата адаптолу (мебікар), який використовується як денний транквілізатор, та препарат, що стабілізує вегетативну нервову систему для лікування вегетативних розладів. Клітинну синхронізовану зависьодноклітинної водорості D. v. в концентрації 15×10^6 клітин/мл вносили послідовно в три лунки планшета по 50 мкл тест-системи, в першу

Таблиця

Структурно-функціональні показники клітин D. v. у сироватці крові пацієнтів із ВД та сумісно з фармпрепаратом

Характеристики клітин D. v.	Контроль, n=28	Сироватка крові хворих на ВД, n=60	Сироватка крові хворих на ВД +адаптол, n=24
	M ± σ	M ± σ	M ± σ
Морфологічні характеристики клітин (%)			
Ланцетоподібні форми	90,6 ± 3,2	71,6 ± 1,8	56,4 ± 1,4
Округлі форми	3,2 ± 0,8	22 ± 1,5	17 ± 0,9
Веретеноподібні форми	3,2 ± 0,8	12,1 ± 1,2	7,8 ± 1,1
Функціональні характеристики клітин (%)			
Рухливі форми	92 ± 1,1	24,1 ± 1,0	19 ± 0,9
Нерухливі форми	4,9 ± 0,6	55,8 ± 0,9	47 ± 0,7
Проміжні форми	1,4 ± 0,7	9 ± 0,8	5,8 ± 0,6
Наявність агрегатів (%)			
Мікроагрегати	–	15,4 ± 0,8	11,8 ± 0,9
Макроагрегати	–	4,5 ± 0,7	2,1 ± 0,8
Коефіцієнт цитотоксичності			
Коефіцієнт морфологічної цитотоксичності	–	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Коефіцієнт функціональної цитотоксичності	–	5,1 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Коефіцієнт загальної цитотоксичності	–	3,5 ± 0,1	2,8 ± 0,1

Примітки: *M — середні значення; σ — стандартне відхилення.*

додавали 50 мкл 0,9% розчину NaCl (контроль), в другу — 50 мкл сироватки крові пацієнтів із ВД для визначення цитотоксичності сироватки пацієнтів, в третю лунку вносили 50 мкл сироватки крові хворих із ВД та 50 мкл розчину адаптолу (з розрахунку мінімальної терапевтичної дози препарату — 900 мг) для визначення вірогідної цитотоксичності фармпрепарату. Одержані результати скринінгу цитотоксичності сироватки крові пацієнтів з використанням клітинного біосенсора D. v. (табл.).

Дослідження морфологічних змін показали, що спонтанний рівень зміни в контролі клітинної тест-системи D. v. складав: округлі форми — 3,2 ± 0,8%; у разі дії сироватки крові хворих на ВД зі зміненими формами збільшився до 22 ± 1,5%, а під час дії сироватки крові хворих на ВД сумісно з терапевтичною дозою адаптолу (мебікар) 900 мг зменшився до 17%, хоча все одно залишався підвищеним.

Індукція функціональних змін зросла під дією сироватки хворих на ВД у 12 разів, а сумісно з адаптолом — в 10 разів і склала відповідно: 55,8 ± 0,9% та 47 ± 0,7% у порівнянні з контролем 4,9 ± 0,6%.

Коефіцієнти морфологічної, функціональної та загальної цитотоксичності в лунках із сироваткою крові хворих на ВД, які обчислювали за вказаними формулами, становили:

$$K_m = \frac{22-3}{10} = 1{,}9;\ K_f = \frac{56-5}{10} = 5{,}1;\ K = \frac{1{,}9+5{,}1}{2} = 3{,}5;$$

сумісно з адаптолом:

$$K_m = \frac{17-3}{10} = 1{,}4;\ K_f = \frac{47-5}{10} = 4{,}2;\ K = \frac{1{,}4+4{,}2}{2} = 2{,}8.$$

Ми бачимо, що середній показник коефіцієнта морфологічної цитотоксичності в групі хворих на ВД зменшився з 1,9 ± 0,1 до 1,4 ± 0,1 в групі хворих на ВД сумісно з фармпрепаратом, а функціональної цитотоксичності — з 5,1 ± 0,1 до 4,2 ± 0,1 відповідно. На нашу думку, позитивною є дія адаптолу (мебікар) та його здатність зменшувати цитотоксичні властивості сироватки крові хворих на ВД. Середній показник коефіцієнта загальної цитотоксичності в групі хворих із ВД становив 3,5 ± 0,1, а в групі з ВД сумісно з адаптолом — 2,8 ± 0,1, що підтверджує позитивний вплив адаптолу (мебікар) на цитотоксичні властивості сироватки крові хворих на АГ. Ці дані необхідно враховувати під час призначення фармпрепарату адаптолу (мебікар).

Необхідно також зазначити, що під впливом цитотоксичних сироваткових чинників клітин біосенсору D. v. здатні утворювати мікро- та макроагрегати (від 5 до 200 клітин) завдяки виділенню ураженими клітинами екзометаболіту, який їх аглютинує (рис. 1).

Наявність агрегатів є найбільш негативною ознакою наявності високотоксичних чинників у сироватці крові. В обстежених хворих ми виявили, що в групі з ВД наявність мікро- і макроагрегатів склало 15,4 ± 0,8% та 4,5 ± 0,7% відповідно, а в групі хворих із ВД сумісно з адаптолом 11,8 ± 0,9% та 2,1 ± 0,8% відповідно. Під дією адаптолу цитотоксичні властивості сироватки хворих на ВД зменшилися в 2 рази. На нашу думку, це також підтверджує позитивний вплив адаптолу (мебікар) на цитотоксичні властивості сироватки крові хворих на ВД, а також із певною мірою відповідальності дає змогу рекомендувати цей фармпрепарат у комплексі лікування хворих на АГ у групі з ВД.

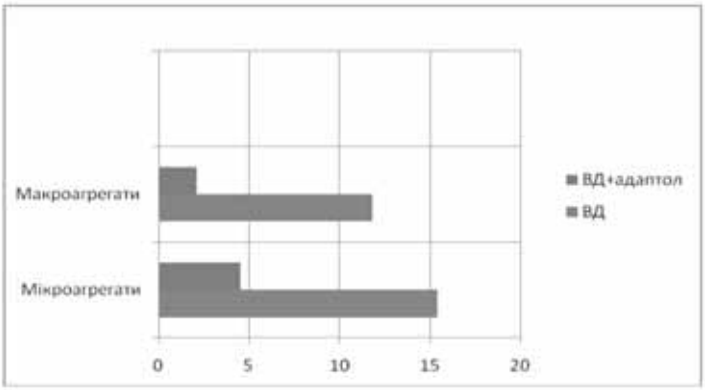

Рис. 1. *Порівняльна характеристика мікро- та макроагрегатів сироватки крові хворих на АГ та сироватки крові пацієнтів із АГ сумісно з адаптолом*

Після проведеного курсу лікування доцільно проводити повторне дослідження цитотоксичності сироватки крові для оцінки ефективності проведеної терапії.

ВИСНОВКИ

Запропонований спосіб скринінг-діагностики створює можливість виявити наявність патогенетично значущих сироваткових цитотоксичних чинників, визначити індивідуальну тактику лікування та випробувати кожний фармпрепарат, що традиційно використовується для лікування вегетативних розладів, на індивідуальну цитотоксичність у системі in vitro.

Використання цієї методики розширює в *перспективі* можливості діагностики хворих на АГ та дає змогу призначення індивідуальної терапії з урахуванням патогенетичних особливостей перебігу такої патології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Абрамов В. В.* Взаимодействие нервной и иммунной систем / В. В. Абрамов // Новосибирск: Наука, 1988. — 163 с.
2. *Волошин П. В.* Эндотелиальная дисфункция у больных с церебральным ишемическим инсультом: пол, возраст, тяжесть заболевания, новые возможности медикаментозной коррекции / П. В. Волошин, В. А. Малахов, А. Н. Завгородняя // Междунар. невр. журн. — 2007. — № 2 (12). — С. 15–20.
3. *Гитун Т. В.* Диагностический справочник кардиолога / Т. В. Гитун // М.: АСТ, 2007. — С. 316–329.
4. Діагностична значимість показників гуморального імунітету у хворих з артеріальною гіпотонією у віддаленому періоді закритої черепно-мозкової травми, церебральним арахноїдитом і вегетативною дисфункцією / О. М. Клімова, О. К. Зінченко, Т. А. Літовченко [та ін.] // Лікарська практика. — 2005. — № 6. — С. 28–31.
5. Использование клеточного биосенсора для интегральной оценки изменений метаболических и иммунологических показателей у больных различными формами миастении до и после операции / Е. М. Климова, Т. И. Кордон, Л. А. Дроздова [и др.] // Биологич. вест. — 2007. — Т. 11, № 2 — С. 9–13.
6. *Кушнир С. М.* Вегетативная дисфункция и вегетативная дистония / С. М. Кушнир, Л. К. Антонова. — Тверь: Губернская медицина, 2007. — 215 с.
7. Нейроиммуноэндокринология тимуса / И. М. Кветной, А. А. Ярилин, В. О. Полякова [и др.]. — СПб: ДЕАН, 2005. — 160 с.
8. *Окороков А. Н.* Нейроциркулярная дистония / А. Н. Окороков, Н. П. Базенко — М.: Мед. лит., 2004. — 192 с.
9. Патент України М. кл. Спосіб діагностики та підбору індивідуального комплексу лікування хворих на артеріальну гіпотонію різного генезу G01N 33/49, № 50071 / О. М. Клімова, О. К. Зінченко // Заяв. 20.11.2009; опубл. 25.05.2010. — Бюл. № 10.
10. *Потапенко В. П.* Низкое давление. Причины и эффективное лечение / В. П. Потапенко // М.: АСТ; СПб: Сова, 2007. — 94 с.
11. *Рабсон А.* Основы медицинской иммунологии / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз // М.: Мир, 2006. — 315 с.
12. Activ solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual Hsp 70 chaperonas / A. Ben-Zvi, P. Delos Rios, G. Dietler [et al.] // J. Biol. Chen. — 2004. — ol. 279. — P. 37298–37303.
13. Increase in fastingvascular endothelial function after short-term oral L-arginine iseffective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysisof randomized controlled trials / V. Bai, L. Sun, M. Vang [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. — 2009. — Vol. 89 (1). — P. 77–84.