



Н. Р. СОХОР, С. І. ШКРОБОТ

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет
ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України»

Мітохондріальна дисфункція у гострий період ішемічного інсульту

Мета — вивчити мітохондріальний потенціал лейкоцитів, вміст внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК) та апоптоз лейкоцитів крові у гострий період ішемічного інсульту (ІІ).

Матеріали і методи. Обстежено 86 хворих з ІІ різних підтипів віком від 45 до 75 років. Визначали кількість лейкоцитів периферичної крові в стадії апоптозу (ANV⁺-клітини) та некрозу (PI⁺-клітини), лейкоцитів з підвищеним вмістом внутрішньоклітинних АФК (АФК⁺-клітини) та лейкоцитів зі зниженим рівнем потенціалу мітохондріальних мембран (Mito⁺-клітини) за допомогою проточного цитофлуориметра Epics XL.

Результати. Встановлено, що у гострий період ІІ усіх підтипів у 1-шу добу мають місце мітохондріальна дисфункція, внутрішньоклітинний оксидантний стрес, апоптоз та некроз лейкоцитів крові, що виявляється збільшенням кількості ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺- та Mito⁺-клітин. На 7-му добу ІІ достовірно знижується вміст PI⁺-, АФК⁺- та Mito⁺-клітин при атеротромботичному та гемодинамічному ІІ. При великих атеротромботичних та кардіоеMBOLІчних ІІ відзначено зростання мітохондріальної дисфункції (збільшення кількості Mito⁺- та АФК⁺-клітин) на 7-му добу та пов'язаних з нею процесів апоптозу та некрозу (підвищення вмісту ANV⁺- і PI⁺-клітин). Виявлено кореляції між кількістю Mito⁺- та ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺-клітин у 1-шу та на 7-му добу ІІ, а також між тяжкістю атеротромботичного ІІ та вмістом Mito⁺- і ANV⁺-клітин.

Висновки. Результати дослідження свідчать про важливу роль мітохондріальної дисфункції у патогенезі різних підтипів ІІ. Встановлено безпосередній вплив мітохондріальної дисфункції та мітохондрій-індукованого апоптозу на перебіг атеротромботичного ІІ у гострий період.

Ключові слова: гострий період ішемічного інсульту, апоптоз, некроз, активні форми кисню, мітохондрії.

Експериментальні дослідження підтвердили, що оксидантний стрес відіграє важливу роль у пошкодженні тканин та клітинній смерті після ішемічного інсульту (ІІ) [11]. Вважають, що мітохондрії, які є основним джерелом активних форм кисню (АФК), беруть участь в апоптозі, індукованому ішемією. Підвищений вміст внутрішньоклітинних іонів Ca²⁺, Na⁺ і ADP спричиняють у мітохондріях появу руйнівних АФК [15]. Мітохондрії є центральними інтеграторами та перетворювачами апоптотичних сигналів у нейронах. На початку ішемії помітно знижується напруга кисню і концентрація глюкози в тканині головного мозку. Ця киснево-глюкозна депривація спричиняє зниження накопичення інтермедіаторів і витік електронів, які генерують

АФК [1]. Утворення АФК залежить від метаболічного стану мітохондрій [9].

АФК, утворені у клітині, призводять до збільшення синтезу мітохондріальних АФК. У мітохондрій-залежному апоптозі молекулярна сигналізація через посередництво АФК повертається у мітохондрії, спричиняючи вивільнення критичних апоптотичних активаторів і ефекторів загибелі клітин, таких як цитохром С або апоптоз-індукуючий фактор, з мітохондріального міжмембранного простору [3]. Мітохондріальна деполяризація та підвищення проникності мембран — найраніші вияви апоптозу [5]. Мітохондрій-ініційований апоптоз може відбуватися внаслідок відкриття мітохондріальних пор через зниження мітохондріального мембранного потенціалу (ММП) [10, 12]. При поширеному відкритті мітохондріальних пор переходу за рахунок значного

© Н. Р. Сохор, С. І. Шкробот, 2014

зниження рівня АТФ та порушення гомеостазу іонів відбувається некротична загибель клітин [14]. У разі відкриття мітохондріальних пор переходу лише у частини мітохондрій, коли клітини все ще мають достатній рівень АТФ, починається апоптоз.

Мета роботи — вивчити мітохондріальний потенціал лейкоцитів, вміст внутрішньоклітинних АФК та апоптоз лейкоцитів крові у гострий період ІІ.

Матеріали і методи

Обстежено 86 хворих з ІІ різних підтипів, які перебували на стаціонарному лікуванні в інсультному відділенні Тернопільської обласної комунальної клінічної психоневрологічної лікарні. Вік хворих — від 45 до 75 років (середній вік — $59,4 \pm 3,7$) року. Частка чоловіків — 55,8%.

Гемодинамічний ішемічний інсульт (ГДІ) діагностовано у 24 (27,9%), атеротромботичний (АТІ) — у 19 (22,1%), кардіоемболічний (КЕІ) — у 23 (26,4%), лакунарний (ЛІ) — у 20 (22,2%) хворих. ІІ локалізувався в каротидному басейні у 68 (79,1%), у вертебробазиллярному басейні — у 18 (20,9%) пацієнтів.

Із супутніх захворювань гіпертонічну хворобу (ГХ) діагностовано в 11 (45,8%) хворих з ГДІ, у 6 (25,0%) з КЕІ та у 9 (30,0%) з ЛІ; атеросклероз (АЗ) — у 3 (15,8%) хворих з ГДІ, у 4 (21,1%) з АТІ та у 3 (15,0%) з ЛІ, поєднання ГХ з АЗ — у 8 (33,3%) хворих з ГДІ, у 15 (78,9%) з АТІ, у 9 (39,1%) з КЕІ та у 10 (50,0%) з ЛІ, ішемічну хворобу серця (ІХС) — у 2 (8,3%) пацієнтів з ГДІ, у 6 (31,6%) з АТІ, у 14 (60,9%) з КЕІ, у 7 (35,0%) з ЛІ. У всіх пацієнтів з КЕІ виявлено фібриляцію передсердь.

До дослідження залучали хворих, госпіталізованих у стаціонар у перші 24 год від початку мозкового інфаркту. Критеріями вилучення були: наявність повторних ІІ, порушення свідомості, тяжче за сопор (за шкалою ком Глазго — менше 9—10 балів), поліорганної недостатності (серцево-легенева декомпенсація, хронічна ниркова патологія). Діагноз мозкового інфаркту верифікували за допомогою спіральної комп'ютерної томографії (СКТ) (Astelon 4, Toshiba). Тяжкість стану хворих та ступінь неврологічного дефіциту оцінювали за шкалою NIHSS у 1-шу та на 7-му добу інсульту. Легкий ІІ у 1-шу добу захворювання діагностовано у 25 (29,1%), середньої тяжкості — у 37 (45,2%), тяжкий — у 24 (27,9%) хворих.

Кількість лейкоцитів периферичної крові у стадії апоптозу та некрозу визначали за допомогою проточного цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, США). Використовували набір ANNEXIN V-FITC-kit (Bender Medsystems, Австрія), який включає анексин А5, кон'югований з флуоресцеїнізотіоціанатом (Annexin A5-FITC), пропідій йодид (PI) і зв'язувальний буфер. Анексин V застосовували для виявлення клітин, які вступили в апоптоз (ANV⁺-клітини), пропідій йодид (PI) — як маркер клітинного некрозу (PI⁺-клітини).

Рівень внутрішньоклітинних АФК у крові вивчали за допомогою проточної цитофлуориметрії з ви-

користанням дихлорфлуоресцеїну діацетата (Sigma Aldrich, США). Значення цього параметра виражали у відсотках (кількість лейкоцитів з підвищеним внутрішньоклітинним вмістом АФК (АФК⁺-клітини) щодо кількості клітин з нормальним вмістом АФК). Визначення кількості клітин зі зниженим рівнем потенціалу мітохондріальних мембран (Mito⁺-клітини) проводили за допомогою реактиву MitoCaptureTM Mitochondrial Apoptosis Detection Fluorometric Kit (Biovision, США). Флуоресцентні сигнали виявляли за допомогою проточного цитофлуориметра з використанням FITC-каналу для зелених мономерів (Ex/Em = 488/ 530 ± 30 нм) і PI-каналу (FL 1) для червоних агрегатів (Em = 488/ 590 ± 42 нм).

Контрольну групу становили 34 хворих, порівнянних за віком і співвідношенням статей.

Статистичну обробку отриманих результатів виконано за допомогою пакета статистичного аналізу IBM SPSS Statistics. Визначали такі показники: середнє значення (M), стандартна похибка (m). Порівняння вибірок здійснено із застосуванням критерію Стьюдента (t) та коефіцієнта кореляції Пірсона (r).

Результати та обговорення

У хворих з ІІ у 1-шу добу виявлено достовірно ($p < 0,05$) вищий вміст лейкоцитів на стадії апоптозу та некрозу і лейкоцитів з підвищеним вмістом внутрішньоклітинних АФК порівняно з контрольною групою. Так, рівень ANV⁺-клітин становив ($25,5 \pm 2,01$)%, PI⁺-клітин — ($1,87 \pm 0,12$)%, АФК⁺-клітин — ($30,57 \pm 2,04$)%, у контрольній групі — відповідно ($5,12 \pm 0,65$), ($0,13 \pm 0,03$) та ($12,1 \pm 2,04$)%. Спостерігали достовірне ($p < 0,05$) підвищення кількості лейкоцитів зі зниженим ММР у гострий період ІІ порівняно з контрольною групою — ($13,46 \pm 0,42$) і ($4,52 \pm 0,25$)%.

Вивчено вміст ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺- та Mito⁺-клітин при різних підтипах ІІ (табл. 1). Установлено, що при всіх підтипах ІІ ці показники достовірно відрізнялися від аналогічних показників контрольної групи ($p < 0,05$).

Найвищий вміст ANV⁺-клітин виявлено у хворих з АТІ (достовірно ($p < 0,05$) вищий, ніж при інших ІІ), що можна пояснити старшим віком цих хворих та більшою тяжкістю інсульту. Установлено, що роль апоптозу в атерогенезі є подвійною залежно від стадії бляшки: на ранніх стадіях апоптоз клітин гладеньких м'язів і запальних клітин, таких як лімфоцити і макрофаги, може затримати розвиток атеросклеротичного процесу, проте на пізніх стадіях він призводить до розриву бляшки і тромбозу [8]. Достовірно ($p < 0,05$) нижчий вміст апоптотичних лейкоцитів відзначено при лакунарному підтипі ІІ. Це свідчить про меншу вираженість апоптозу при мікросудинному ураженні при ІІ. При КЕІ та ГДІ кількість ANV⁺-клітин достовірно не відрізнялася. Отже, у 1-шу добу найбільше на вміст апоптотичних лейкоцитів впливала наявність атеросклерозу мозкових судин.

Таблиця 1
Вміст ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺- та Mito⁺-клітин у 1-шу добу при різних підтипах II (M ± m), %

Тип II	ANV ⁺ -клітини	PI ⁺ -клітини	АФК ⁺ -клітини	Mito ⁺ -клітини
КЕІ	28,24 ± 1,12	1,92 ± 0,11	39,12 ± 2,86	13,23 ± 0,53
ГДІ	27,86 ± 1,29	1,86 ± 0,13	35,68 ± 2,13	13,67 ± 0,56
АТІ	31,51 ± 2,35	2,08 ± 0,17	35,21 ± 3,11	15,33 ± 0,74
ЛІ	24,25 ± 1,93	1,61 ± 0,13	30,71 ± 2,55	12,00 ± 0,35

Таблиця 2
Вміст АФК⁺-лейкоцитів та Mito⁺-клітин на 7-му добу при різних підтипах II (M ± m), %

Тип II	ANV ⁺ -клітини	PI ⁺ -клітини	АФК ⁺ -клітини	Mito ⁺ -клітини
КЕІ	31,75 ± 1,99	1,76 ± 0,16	34,65 ± 2,64	12,75 ± 1,25
ГДІ	28,81 ± 2,59	1,50 ± 0,15	29,91 ± 2,91	11,00 ± 0,54
АТІ	29,42 ± 1,39	1,61 ± 0,17	28,62 ± 1,15	12,00 ± 0,27
ЛІ	25,10 ± 0,12	1,67 ± 0,10	31,45 ± 1,25	11,71 ± 0,34

Кількість PI⁺ клітин також була достовірно ($p < 0,05$) вищою при АТІ, ніж при ГДІ та ЛІ. Достовірної різниці з показниками хворих з КЕІ не виявлено. Достовірно ($p < 0,05$) нижчий вміст PI⁺-клітин порівняно з хворими з іншими підтипами II спостерігали при ЛІ.

Установлено достовірно вищий, ніж при інших підтипах II, рівень Mito⁺- ANV⁺- та PI⁺-клітин у хворих з АТІ. При КЕІ та ГДІ кількість Mito⁺-клітин достовірно не відрізнялася. При ЛІ відзначено достовірно нижчу кількість лейкоцитів зі зниженим трансмембранним потенціалом порівняно з іншими підтипами II.

Найбільшу кількість лейкоцитів з підвищеним рівнем АФК виявлено при КЕІ.

Останні дослідження показали, що утворені у мітохондріях АФК є медіаторами молекулярних сигналів, які залучені у мітохондрій-залежний апоптотичний шлях, що включає про- й антиапоптотичні зв'язувальні білки, вивільнення цитохрому С і транскрипційно-незалежний р-53 сигнальний шлях, який призводить до нейрональної смерті. При КЕІ в умовах ранньої реперфузії відбувається гіперпродукція внутрішньоклітинних АФК, переважно у мітохондріях. Останні є як джерелом, так і мішенню для внутрішньоклітинних АФК, які утворюються внаслідок окисно-відновних реакцій у мітохондріальному матриксі [6]. Мітохондрії легко пошкоджуються АФК, оскільки вони складаються із внутрішніх і зовнішніх мембранних структур, які містять рідини і білки, котрі у першу чергу руйнуються АФК [13].

Експериментальні дослідження засвідчили, що з виникненням церебральної ішемії починається і в результаті подальшої реперфузії збільшується набухання мітохондрій, яке досягає максимуму через

24 год після реперфузії. Електронна мікроскопія виявила, що пошкоджені мітохондрії мають суттєві колапси в обох внутрішніх і зовнішніх мембранах після ішемії-реперфузії, неправильну форму, фрагментарні кісти і виражену дилатацію внутрішньокриптових просторів [11].

Виявлено, що при ГДІ та АТІ у 1-шу добу II вміст АФК⁺-лейкоцитів був достовірно ($p < 0,05$) нижчим, ніж при КЕІ, та вищим, ніж при ЛІ. При ЛІ спостерігали достовірно ($p < 0,05$) нижчу кількість АФК⁺-клітин порівняно з іншими підтипами II.

Таким чином, у 1-шу добу II найбільш виражену мітохондріальну дисфункцію виявлено при АТІ, що виявлялося найвищим рівнем Mito⁺-клітин, апоптозом та некрозом лейкоцитів крові. При КЕІ зафіксовано найбільше утворення внутрішньоклітинних АФК. Найменш виражені процеси мітохондріальної дисфункції спостерігали при ЛІ.

Проаналізовано вміст ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺- та Mito⁺-лейкоцитів периферичної крові на 7-му добу інсульту (табл. 2).

При всіх підтипах II кількість PI⁺-клітин залишалася достовірно ($p < 0,05$) вищою порівняно з показником контрольної групи. Кількість PI⁺-клітин у периферичній крові на 7-му добу II достовірно знижувалася при ГДІ та АТІ. Найнижчі значення PI⁺-клітин виявлено при ГДІ, при якому основним патогенетичним механізмом є вазоспазм мозкових судин. При КЕІ кількість некротичних клітин зменшувалася недостовірно і залишалася найвищою на 7-му добу порівняно з іншими II. Отримані результати щодо динаміки рівня PI⁺-клітин при II свідчать про те, що загибель клітин шляхом некрозу при мозковому інфаркті при всіх підтипах II найбільш виражена у перші доби інсульту. У подальшо-

му некротична загибель клітин зменшується, особливо при АТІ та ГДІ. На 7-му добу при всіх підтипах ІІ кількість PI^+ -лейкоцитів достовірно не відрізнялася. Виявлено, що при ЛІ кількість лейкоцитів на стадії некрозу практично не змінювалася порівняно з 1-ю добою. Можливо, при ЛІ запускаються інші механізми загибелі клітин шляхом некрозу, не лише мітохондрій-індуковані. Незважаючи на невеликі розміри інфарктного вогнища при ЛІ, кількість лейкоцитів на стадії некрозу достовірно не відрізнялася від показників хворих з іншими підтипами ІІ. Ймовірно, такі показники зумовлені зривом компенсації при системному ураженні дрібних судин головного мозку. Вищі показники PI^+ -лейкоцитів виявлено у разі наявності двох або трьох лакунарних вогнищ на КТ порівняно з хворими з одним вогнищем.

Установлено, що при КЕІ на 7-му добу достовірно зростала кількість ANV^+ -клітин. Припускаємо, що важливу роль у цьому відіграє високий вміст внутрішньоклітинних АФК у 1-шу добу захворювання, що сприяє активації апоптотичних процесів. При ГДІ та АТІ вміст клітин у стадії апоптозу достовірно не змінювався. При всіх підтипах ІІ кількість лейкоцитів на стадії апоптозу на 7-му добу захворювання залишалася достовірно ($p < 0,05$) вищою, ніж у контрольній групі. Найнижчою кількістю лейкоцитів на стадії апоптозу залишалася при ЛІ.

Рівень $Mito^+$ -клітин достовірно знижувався при ГДІ та АТІ поряд зі зменшенням кількості PI^+ -лейкоцитів. При КЕІ та ЛІ не виявлено достовірного зниження кількості клітин зі зниженим ММП. Установлено, що мітохондрії зазнають значного пошкодження на етапі реперфузії [17]. Виявлено суттєві відмінності мітохондрій, як за структурою, так і за функціями у разі постійної ішемії та ішемії з ранньою реперфузією. Доведено, що реперфузія спричиняє грубіші зміни мітохондрій нейрональних клітин у зоні як інфарктного ядра, так і у пенумбрі. До 24-ї години після реперфузії мітохондрії повністю втрачають зовнішню мембрану та форму.

Установлено, що на 7-му добу при ГДІ та АТІ достовірно ($p < 0,05$) знижувалася кількість АФК $^+$ -лейкоцитів, при КЕІ та ЛІ — достовірно не змінювалася. Найвищий вміст АФК $^+$ -клітин зафіксовано при КЕІ.

Таким чином, найактивніші процеси апоптозу та некрозу лейкоцитів у 1-шу добу ІІ мають місце при АТІ. На 7-му добу інтенсивність апоптотичних процесів при КЕІ та АТІ — однакова. На нашу думку, важливу роль при цьому відіграє мітохондріальна дисфункція, зумовлена пригніченням синтезу АТФ за рахунок зниження мітохондріального потенціалу, накопиченням іонів Ca^{2+} у клітинах, утворенням внутрішньоклітинних АФК. Вважають, що раннє збільшення утворення АФК мітохондріями при реперфузії є одним із чинників, який спричиняє мітохондріальну дисфункцію та посилює реперфузійне пошкодження [7].

Незважаючи на в цілому позитивну динаміку вмісту внутрішньоклітинних АФК на 7-му добу ІІ, у частини пацієнтів з АТІ та КЕІ виявлено збільшення кількості АФК $^+$ -клітин. У цих хворих діагностовано тяжкий ІІ великого розміру (понад 100 cm^3), з набряком та порушенням свідомості при госпіталізації (12—13 балів за шкалою ком Глазго). За даними деяких авторів, вторинне пошкодження виникає після набряку мозку, мікросудинної недостатності та вазомоторного дефіциту, що призводить до зниження перфузії крові й запалення [4]. Це спричиняє активацію мікроглії та інфільтрацію мозку периферичними запальними клітинами. Такі процеси особливо виражені при реперфузії в результаті різкого масового надходження лейкоцитів та АФК в ушкоджений мозок.

При АТІ збільшення кількості АФК $^+$ -клітин супроводжувалося зростанням рівня ANV^+ -, PI^+ - та $Mito^+$ -клітин. Це свідчить про те, що при тяжких АТІ великого розміру процеси апоптозу та некрозу тривають протягом одного тижня гострого періоду, ймовірно, беручи участь у «доформуванні» ішемічного вогнища. При КЕІ великого розміру виявлено збільшення кількості АФК $^+$ -клітин, незначне зростання вмісту ANV^+ -клітин та достовірне підвищення рівня PI^+ - та $Mito^+$ -клітин.

Кореляційний аналіз виявив тісний прямий взаємозв'язок між показниками апоптозу, мітохондріальним трансмембранним потенціалом та рівнем АФК лейкоцитів у крові, що свідчило про мітохондріальний шлях ініціації апоптозу. Встановлено достовірні позитивні кореляційні зв'язки між кількістю АФК $^+$ - та $Mito^+$ -клітин у 1-шу добу ІІ ($r = 0,869$, $p = 0,001$). Виявлені кореляції свідчать про те, що утворення АФК у хворих з ІІ пов'язане з мітохондріальною дисфункцією та зниженням ММП. Мітохондрії вважають основним джерелом АФК у нейронах, ці окиснювачі є посередниками молекулярних сигналів у мітохондрій-залежному шляху клітинної смерті [16]. ММП відображає ефективність ланцюга транспорту електронів і може вказувати на порушення енергетичного обміну в мітохондріях [2].

Достовірний позитивний кореляційний зв'язок виявлено також між кількістю $Mito^+$ - та ANV^+ -клітин ($r = 0,617$, $p = 0,002$) у 1-шу добу захворювання. Особливо тісну залежність встановлено при АТІ ($r = 0,838$, $p = 0,004$). Наведені дані свідчать про один із можливих шляхів ініціації апоптозу — мітохондріальний — у гострий період ІІ, найбільш виражений при АТІ. Також встановлено сильний позитивний кореляційний зв'язок між кількістю лейкоцитів зі зниженим ММП та PI^+ -клітин ($r = 0,782$, $p = 0,001$) і позитивний кореляційний зв'язок між кількістю $Mito^+$ - та АФК $^+$ -клітин ($r = 0,679$, $p = 0,001$).

Схожі тенденції спостерігали на 7-му добу мозкового інфаркту. Виявлено достовірні позитивні кореляційні зв'язки між кількістю $Mito^+$ - та АФК $^+$ -клітин ($r = 0,623$, $p = 0,041$), ANV^+ -клітин ($r = 0,606$,

$p = 0,005$), PI^+ -клітин ($r = 0,662$, $p = 0,001$). Не встановлено кореляційного зв'язку тяжкості II та кількості лейкоцитів зі зниженим мітохондріальним потенціалом. Виявлено залежність між тяжкістю АТІ та кількістю $Mito^+$ -клітин у 1-шу ($r = 0,742$, $p = 0,049$) та на 7-му ($r = 0,717$, $p = 0,050$) добу, між тяжкістю АТІ та кількістю ANV^+ -клітин на 7-му добу мозкового інфаркту ($r = 0,848$, $p = 0,052$).

Висновки

У гострий період II всіх підтипів у 1-шу добу спостерігають мітохондріальну дисфункцію, внутрішньоклітинний оксидантний стрес, апоптоз та некроз лейкоцитів крові, що виявляється збільшенням кількості ANV^+ -, PI^+ -, AFK^+ - та $Mito^+$ -клітин.

На 7-му добу II достовірно знижується вміст PI^+ -, AFK^+ - та $Mito^+$ -клітин при АТІ та ГДІ.

При великих АТІ та КЕІ відзначено посилення мітохондріальної дисфункції (підвищення кількості $Mito^+$ - та AFK^+ -клітин) на 7-му добу і пов'язаних з нею процесів апоптозу та некрозу (збільшення вмісту ANV^+ - і PI^+ -клітин).

Виявлені кореляції між кількістю $Mito^+$ - та ANV^+ -, PI^+ -, AFK^+ -клітин у 1-шу та на 7-му добу II свідчать про важливу роль мітохондріальної дисфункції у патогенезі різних підтипів II.

Кореляційні зв'язки між тяжкістю АТІ та вмістом $Mito^+$ - і ANV^+ -клітин свідчать про прямий вплив мітохондріальної дисфункції та мітохондрій-індукованого апоптозу на перебіг АТІ у гострий період.

Література

1. Abramov A. Y., Scorziello A., Duchon M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation // *J. Neurosci.* — 2007. — Vol. 27. — P. 1129—1138.
2. Alfadda A. A., Sallam R. M. Reactive oxygen species in health and disease // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2012. — P. 936486.
3. Brandes R. P. Triggering mitochondrial radical release: a new function for NADPH oxidases // *Hypertension.* — 2005. — Vol. 45. — P. 847—848.
4. Fritz H. G. Secondary injuries in brain trauma: effects of hypothermia // *J. Neurosurg. Anesthesiol.* — 2004. — Vol. 16. — P. 43—52.
5. Harfouche R., Hassessian H. M., Guo Y. Mechanisms, which mediate the antiapoptotic effects of angiotensin-1 on endothelial cells // *Microvasc. Res.* — 2002. — Vol. 64. — P. 135—147.
6. Huang H. F., Guo F., Cao Y. Z. et al. Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) mimics: antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke // *CNS Neurosci. Ther.* — 2012. — Vol. 18. — P. 811—818.
7. Jian-min Liang, Hai-yang Xu, Xiao-jie Zhang. Role of mitochondrial function in the protective effects of ischaemic preconditioning on ischaemia/reperfusion cerebral damage // *J. Internat. Med. Res.* — 2013. — Vol. 41 (3). — P. 618—627.
8. Karafliou M., Lambrinouadaki I., Christodoulakos G. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review // *Mini Rev. Med. Chem.* — 2008. — Vol. 8 (9). — P. 912—918.
9. Kushnareva Y., Murphy A. N., Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome C and NAD (P)⁺ oxidation-reduction state // *Biochem. J.* — 2002. — Vol. 368. — P. 545—553.
10. Lemasters J. J., Theruvath T. P., Zhong Z. et al. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2009. — Vol. 1787. — P. 1395—1401.
11. Li J., Ma X., Yu W. et al. Reperfusion promotes mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia in rats // *PLoS One.* — 2012. — N 7. — P. e46498—e46498.
12. Lin H. C., Lee T. K., Tsai C. C. et al. Ischemic preconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition // *Transplantation.* — 2012. — Vol. 93. — P. 265—271.
13. Nemethova M., Danielisova V., Gottlieb M. et al. Post-conditioning exacerbates the MnSOD immune-reactivity after experimental cerebral global ischemia and reperfusion in the rat brain hippocampus // *Cell. Biol. Int.* — 2008. — Vol. 32. — P. 128—135.
14. Niizuma K., Endo H., Chan P. H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival // *J. Neurochem.* — 2009. — Vol. 109 (suppl. 1). — P. 133—138.
15. Pradeep H., Diya J., Shashikumar S., Rajanikant G. Oxidative stress — assassin behind the ischemic stroke // *Folia Neuro-pathol.* — 2012. — Vol 50 (3). — P. 219—230.
16. Sena L. A., Chandel N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species // *Mol. Cell.* — 2012. — Vol. 48. — P. 158—167.
17. Solenski N., di Piero C., Patricia A. et al. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia // *Stroke.* — 2002. — Vol. 33. — P. 816—824.

Н. Р. СОХОР, С. И. ШКРОБОТ

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет им. И. Я. Горбачевского МЗ Украины»

Митохондриальная дисфункция в острый период ишемического инсульта

Цель — изучить митохондриальный потенциал лейкоцитов, содержание внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) и апоптоз лейкоцитов крови в острый период ишемического инсульта (ИИ).

Материалы и методы. Обследовано 86 больных с ИИ разных подтипов в возрасте от 45 до 75 лет. Определяли количество лейкоцитов периферической крови в апоптозе (ANV^+ -клетки) и некрозе (PI^+ -клетки),

лейкоцитов с повышенным содержанием внутриклеточных АФК (АФК⁺-клетки) и лейкоцитов с пониженным уровнем потенциала митохондриальных мембран (Mito⁺-клетки) с помощью проточного цитофлуориметра Epics XL.

Результаты. Установлено, что в острый период ИИИ всех подтипов в 1-е сутки имеют место митохондриальная дисфункция, внутриклеточный оксидантный стресс, апоптоз и некроз лейкоцитов крови, что проявляется повышением количества ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺- и Mito⁺-клеток. На 7-е сутки ИИИ достоверно снижается содержание PI⁺-, АФК⁺- и Mito⁺-клеток при атеротромботическом и гемодинамическом ИИИ. При больших атеротромботических и кардиоэмболических ИИИ отмечено усиление митохондриальной дисфункции (повышение количества Mito⁺- и АФК⁺-клеток) на 7-е сутки и связанных с ней процессов апоптоза и некроза (увеличение содержания ANV⁺- и PI⁺-клеток). Выявлена корреляция между количеством Mito⁺- и ANV⁺-, PI⁺-, АФК⁺-клеток в 1-е и на 7-е сутки ИИИ, а также между тяжестью атеротромботического ИИИ и содержанием Mito⁺- и ANV⁺-клеток.

Выводы. Результаты исследования свидетельствуют о важной роли митохондриальной дисфункции в патогенезе разных подтипов ИИИ. Установлено прямое влияние митохондриальной дисфункции и митохондриально-индуцированного апоптоза на течение атеротромботического ИИИ в острый период.

Ключевые слова: острый период ишемического инсульта, апоптоз, некроз, активные формы кислорода, митохондрии.

N. R. SOKHOR, S. I. SHKROBOT

I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University of Health Ministry of Ukraine

Mitochondrial dysfunction in the acute period of ischemic stroke

Objective — to study the mitochondrial potential of leukocytes, intracellular reactive oxygen species and apoptosis of white blood cells in the acute period of ischemic stroke (IS).

Methods and subjects. The study involved 86 patients with different subtypes of IS aged from 45 to 75. We determined the number of leukocytes in peripheral blood in apoptosis (ANV⁺-cells) and necrosis (PI⁺-cells), white blood cells with a high content of intracellular ROS (ROS⁺-cells) and leukocytes with reduced levels of mitochondrial membrane potential (Mito⁺-cells) by flow cytometry Epics XL.

Results. We found that in the acute period of all subtypes of IS mitochondrial dysfunction occurs on 1st day, intracellular oxidative stress, apoptosis and necrosis of white blood cells, which shows an increasing number of ANV⁺-, PI⁺-, ROS⁺- and Mito⁺-cells, also present. On the 7th day we observed the reduction of PI⁺-, ROS⁺- and Mito⁺-cells in atherothrombotic and hemodynamic IS. At the large atherothrombotic and cardioembolic IS the marked increase of mitochondrial dysfunction (increased number of Mito⁺- and ROS⁺-cells) on the 7th day was determined and the related processes of apoptosis and necrosis (increase the level of ANV⁺- and PI⁺-cells) were also present. Correlation between the number of Mito⁺-cells and ANV⁺-, PI⁺-, ROS⁺-cells in the 1st and 7th day of IS were observed. Were found correlation between the severity of atherothrombotic IS and content of Mito⁺- and ANV⁺-cells.

Conclusions. The results of the study indicate a role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of different subtypes of IS. A direct effect of mitochondrial dysfunction and mitochondrial-induced apoptosis in atherothrombotic second course in the acute period was demonstrated.

Key words: acute period of ischemic stroke, apoptosis, necrosis, reactive oxygen species, mitochondria.