

АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ ПРИ РІЗНИХ ПІДТИПАХ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ В ГОСТРОМУ ПЕРІОДІ

©Н. Р. Сохор

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

РЕЗЮМЕ. Вивчено вміст лейкоцитів крові у стадії апоптозу і некрозу та з підвищеним внутрішньоклітинним рівнем активних форм кисню (АФК) методом проточної цитофлуориметрії у хворих у гострому періоді ішемічного інсульту (ІІ). Найвищий вміст ANV⁺- та PI⁺-клітин виявлено при атеротромботичному ІІ, а рівень АФК⁺ – при кардіоемболічному ІІ, найнижчі значення – при лакунарному ІІ. При тяжкому та дуже тяжкому ІІ достовірно вищим був вміст ANV⁺-, PI⁺- та АФК⁺-клітин, порівняно з легким мозковим інсультом, при середньотяжкому – лише ANV⁺-клітин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гострий період ішемічного інсульту, апоптоз, некроз, активні форми кисню.

Вступ. Етапи пошкодження мозку людини при ішемічному інсульті (ІІ) вивчені недостатньо. Проте результати експериментів на тваринах свідчать, що патофізіологічні механізми мозкового інфаркту є складними і включають в себе ексайтотоксичність, запалення, окисне пошкодження, іонний дисбаланс, апоптоз та інші механізми загибелі клітин, ангиогенез і нейропротекцію [10, 12]. Більшість клітин при ІІ гине протягом перших годин внаслідок некрозу, але надалі зона інфаркту протягом кількох днів чи тижнів може збільшуватись за рахунок інших механізмів, зокрема апоптозу в зоні колишньої пенумбри [4]. Встановлено, що апоптоз і некроз – два типи клітинної смерті після ІІ [11]. При мозковому інфаркті загибель клітин починається зі зниження кровотоку та підвищення вмісту активних форм кисню (АФК) [14]. При цьому індукуються апоптичні механізми та настає нейрональна смерть. Кінцевим результатом складного ішемічного каскаду є загибель нейронів з необоротною втратою їхніх функцій.

Хоча інсульт є провідною неврологічною причиною смерті і тяжкої тривалої інвалідності у розвинених країнах [2], проте функціональний результат після інсульту, як і раніше, в значній мірі непередбачуваний, точно його спрогнозувати з клінічної картини при госпіталізації інколи дуже важко [6, 16]. Стан пацієнтів з ІІ, які на початку захворювання мали однаковий неврологічний дефіцит, може істотно поліпшитися або погіршитися в перші дні після інсульту [7]. На думку деяких авторів, наявність апоптозу нейронів ішемічної напівтини [15] і можна пояснити порушення функціонального відновлення хворих [8] після ІІ та поганий прогноз захворювання.

Первинні знання про апоптоз після ішемії головного мозку були значною мірою обмежені його виникненням в нейронах і майже всі апоптичні клітини в зоні ішемії були визначені як нейрональні [9]. Проте спостерігається стійке зростання доказів щодо апоптозу і в інших клітинах головного мозку після інсульту. Наприклад, у деяких експеримен-

тальних моделях ІІ було виявлено апоптоз клітин глії та лейкоцитів, які проникають у вогнище церебральної ішемії, пошкодження ДНК у прикордонній зоні інфаркту (пенумбрі) в астроцитах [13]. Тому, на наш погляд, зважаючи на труднощі у дослідженні процесів апоптозу в клітинах мозку людини, інтерес представляє вивчення апоптозу та оксидативного стресу в лейкоцитах крові, враховуючи важливу роль АФК у процесах нейрональної смерті.

Мета роботи: вивчення вмісту лейкоцитів периферійної крові на стадії апоптозу і некрозу та лейкоцитів з підвищеним рівнем внутрішньоклітинних АФК при різних підтипах ІІ у гострому періоді.

Матеріали і методи дослідження. Ми обстежили 86 хворих з різними підтипами ІІ, які перебували на стаціонарному лікуванні в інсультному відділенні Тернопільської обласної комунальної клінічної психоневрологічної лікарні. Гемодинамічний ішемічний інсульт (ГДІ) діагностовано у 24 (27,9 %) обстежуваних пацієнтів, атеротромботичний (АТІ) – у 19 (22,1 %), кардіоемболічний (КЕІ) – у 23 (26,4 %) та лакунарний (ЛІ) – у 20 (22,2 %) хворих. ІІ в каротидному басейні спостерігали у 68 (79,1 %), у вертебробазиллярному – у 18 (20,9 %) пацієнтів. Вік хворих склав від 45 до 76 років (в середньому (59,4±3,7) р.). Середній вік хворих з ГДІ становив (60,0±2,4) р, з АТІ – (67,1±1,9) р., з КЕІ – (63,8±3,7) р. та з ЛІ – (61,1±2,8) р. Хворі були поділені на 2 вікові групи: І – 41 (47,7 %) пацієнт віком від 45 до 60 р., ІІ – 45 (52,3 %) хворих, старших 60 р. Частка чоловіків становила 55,8 %, жінок – 44,2 %.

До обстеження були включені хворі, які надходили у стаціонар у перші 24 години від початку мозкового інфаркту. Критеріями виключення були: наявність повторних ІІ та порушення свідомості глибше за сопор (за шкалою Глазго менше 9–10 балів) та наявність у пацієнта поліорганної недостатності (серцево-легеневої декомпенсації, хронічної ниркової патології). Діагноз мозкового інфаркту верифікували за допомогою спіральної комп'ютерної томографії (КТ) (Astelon 4, Toshiba).

Тяжкість стану хворих та ступінь неврологічного дефіциту оцінювали за шкалою NIHSS на 1, 7 та 14 доби інсульту. Легкий II на 1 добу захворювання діагностовано у 25 (29,1 %), середньотяжкий – у 37 (45,2 %), тяжкий – у 16 (18,6 %) та тяжкий – у 8 (9,3 %) хворих.

Кількість лейкоцитів периферійної крові в апоптозі та некрозі 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 (Анексін А5-FITC), пропідій йодид (PI) і зв'язуючий буфер. Анексин V застосовували для виявлення клітин, які вступили в апоптоз (ANV⁺-клітини). Пропідій йодид (PI) використовували в якості маркера клітинного некрозу (PI⁺-клітини) [5]. Досліджувану популяцію клітин гейтували в координатах FSC (вісь абсцис) і SSC (вісь ординат), потім аналізували на наявність флуоресценції в координатах на основі Dot Plot. Використовували автоматичне програмне забезпечення і методи збору та аналізу даних з високою роздільною здатністю (1024 канали). Отримані результати представляли у відсотках (співвідношення числа ANV⁺-клітин PI⁺-клітин до загальної кількості фракції лейкоцитів).

Для вимірювання рівня АФК у крові використовували дихлорфлуоресцеїну діацетат (ДФХ-ДА)

(«Sigma Aldrich», USA), який є барвником із заблокованою флуоресценцією. Після 20-хвилинної інкубації з цим препаратом реакцію зупинили 200 мкл лізуючого розчину. Потім оцінювали параметри зеленої флуоресценції в клітинах, виявлених на FL1-каналі за допомогою проточної цитофлуориметрії Epics XL (Beckman Coulter, США) [1]. Значення досліджуваного параметра виражали у відсотках (кількість лейкоцитів з підвищеним внутрішньоклітинним вмістом АФК (АФК⁺-клітини) до кількості клітин з нормальним вмістом АФК). Контрольну групу (КГ) склали 34 хворих, репрезентативні за віком і статтю по відношенню до хворих з II.

Статистичну обробку отриманих результатів виконано з використанням пакета статистичного аналізу Statistica 8. Визначали наступні показники: середнє значення (M), стандартна помилка (m). Порівняння вибірок здійснено із застосуванням критерію Стьюдента (t).

Результати й обговорення. Встановлено, що у КГ досліджувана клітинна популяція характеризувалася переважно живими і невеликою групою апоптичних лейкоцитів (табл. 1). У крові хворих у гострому періоді II вміст ANV⁺ та PI⁺ клітин достовірно (p<0,05) перевищував значення КГ відповідно у 3,92 та 6,92 раза. Кількість АФК⁺-клітин у пацієнтів з II також була достовірно (p<0,05) вищою, ніж у КГ – у 2,53 раза.

Таблиця 1. Вміст ANV⁺, PI⁺ та АФК⁺ лейкоцитів у гострому періоді II (M±m)

Показник	Контрольна група (n=34)	Хворі з II (n=86)
ANV ⁺ клітини, %	5,12±1,31	25,5±2,01*
PI ⁺ клітини, %	0,13±0,03	1,87±0,12*
АФК ⁺ -клітини, %	12,1±2,04	30,57±2,04*

Примітка. * – показники достовірні по відношенню до значень контрольної групи.

Враховуючи, що АФК відіграють важливу роль у каскаді складних патобіохімічних порушень при II, нами було проведено вивчення залежності між вмістом АФК⁺-клітин та кількістю лейкоцитів на стадії апоптозу та некрозу. Виявлено тісний прямий кореляційний зв'язок між вмістом АФК⁺-клітин та кількістю анексин-позитивних клітин (r=0,675, p=0,003), а також між кількістю АФК⁺ і PI⁺-позитивних клітин (r=0,571, p=0,002) у гострому періоді II.

Проаналізовано рівень лейкоцитів у апоптозі та некрозі при різних патогенетичних підтипах II (табл. 2). Найвищий вміст ANV⁺ клітин виявлено у хворих з АТІ (достовірно (p<0,05) вищий, ніж при всіх інших підтипах II). На наш погляд, це зумовле-

но старшим віком даної групи хворих та більшою тяжкістю саме АТІ. Крім того, апоптоз безпосередньо бере участь в атеросклерозі мозкових судин. Апоптоз у судинах гладких м'язів та ендотеліальних клітинах сприяє розвитку атеросклерозу, кальцифікації бляшки та збільшенню розмірів некротичного стержня. Вважають, що саме апоптична клітинна загибель має відношення до нестабільності бляшки, її розриву та утворення тромбу [3] з наступним розвитком II. Разом з тим, апоптоз лейкоцитів можна розглядати як захисну реакцію, спрямовану на зменшення кількості клітин імунної системи, які беруть участь в процесах запалення при II.

Таблиця 2. Вміст ANV⁺, PI⁺ та АФК⁺-лейкоцитів у хворих з різним патогенетичним підтипом II (M±m)

Показник	Тип II			
	КЕІ (n=23)	АТІ (n=19)	ГДІ (n=24)	ЛІ (n=20)
ANV ⁺ клітини, %	25,08±1,12	29,19±1,33	26,86±1,03	19,37±0,77
PI ⁺ клітини, %	1,95±0,16	2,08±0,11	1,71±0,10	1,66±0,13
АФК ⁺ -клітини, %	39,51±3,23	28,00±3,08	25,60±2,95	25,87±2,66

Кількість PI⁺ клітин при АТІ була достовірно ($p < 0,05$) вищою, ніж при ГДІ та ЛІ, та достовірно не відрізнялася від значень хворих з КЕІ. Найнижчий вміст анексинV-позитивних та PI⁺-клітин виявлено у пацієнтів з ЛІ. Співвідношення між AN⁺ та PI⁺ клітинами при КЕІ склало 12,86, при АТІ – 14,0, ГДІ – 15,71, ЛІ – 11,67. Тобто, при ГДІ відмічено відносно більше переважаання лейкоцитів у стадії апоптозу, а при ЛІ – у стадії некрозу.

Найвищий вміст лейкоцитів з підвищеним рівнем АФК діагностовано при КЕІ (достовірно вищий, ніж при інших підтипах ІІ). Це може бути пов'язано з ранньою постішемичною реперфузією

при мозковій емболії, при якій, за даними деяких авторів, саме починає генеруватися найбільша кількість АФК. Найвищий рівень АФК⁺-клітин нами виявлено у 5 хворих з КЕІ з геморагічною трансформацією (42,6±1,17) %. Достовірної різниці між кількістю лейкоцитів з підвищеним вмістом АФК у периферійній крові при АТІ, ГДІ та ЛІ не спостерігалось. Тобто, вираженість оксидативного стресу у лейкоцитах при некардіогенних ІІ є меншою, ніж при КЕІ.

Проаналізовано тяжкість ІІ та ступінь регресу неврологічної симптоматики при різних підтипах ІІ у перші 2 тижні гострого періоду ІІ (табл. 3).

Таблиця 3. Тяжкість різних підтипів ІІ на 1, 7 та 14 доби за NIHSS

Вид інсульту	NIHSS		
	1 доба	7 доба	14 доба
КЕІ	11,42±0,54	10,20±0,48	8,95±0,59*
АТІ	11,27±0,57	12,26±0,69	10,65±0,60
ГДІ	9,24±0,54	7,77±0,49*	6,56±0,38*
ЛІ	7,1±0,70	5,8±0,41*	4,27±0,50*

Примітка. * – показники достовірні по відношенню до значень NIHSS на 1 добу ІІ.

Як видно з таблиці 3, тяжкість КЕІ достовірно ($p < 0,05$) зменшувалася лише на 14 день захворювання, тяжкість ГДІ та ЛІ була достовірно ($p < 0,05$) нижчою вже на 7 день захворювання. Відмічено, що в обстежуваних хворих з АТІ тяжкість інсульту на 7 добу захворювання стала вищою, ніж при поступленні, а на 14 зменшувалася по відношенню до 1 дня, проте не достовірно.

При порівнянні значень вмісту кількості ANV⁺-, PI⁺- та АФК⁺-клітин відмічено їх достовірно вищі значення у пацієнтів з різним ступенем тяжкості

мозкового інсульту, порівняно з КГ (табл. 4). Було виявлено, що кількість ANV⁺-клітин при легкому ІІ була достовірно нижчою, ніж при всіх інших ступенях тяжкості ІІ. При дуже тяжкому мозковому інфаркті рівень лейкоцитів на стадії апоптозу достовірно ($p < 0,01$) перевищував їх вміст при легкому, середньому та тяжкому ступенях ІІ. Рівень лейкоцитів, позитивних за пропідію йодидом, та АФК⁺-клітин по відношенню до хворих з легким ІІ був достовірно вищим лише при тяжкому ($p < 0,05$) та дуже тяжкому ($p < 0,01$) інсульті.

Таблиця 4. Вміст AN⁺, PI⁺ та АФК⁺-клітин у хворих з різним ступенем тяжкості ІІ (M±m)

Показник	Ступінь важкості ІІ			
	легкий (n=25)	середній (n=37)	тяжкий (n=16)	дуже тяжкий (n=8)
ANV ⁺ -клітини, %	21,08±1,61	25,91±1,15*	26,57±1,03*	40,01±0,83*
PI ⁺ -клітини, %	1,59±0,15	1,82±0,13	2,16±0,20*	3,04±0,17*
АФК ⁺ -клітини, %	24,25±1,90	25,66±2,01	31,16±2,25*	32,23±1,84*

Примітка. * – показники достовірні по відношенню до значень хворих з легким ІІ.

Проаналізовано залежність між тяжкістю стану хворого протягом гострого періоду ІІ та вмістом AN⁺, PI⁺ та АФК⁺-клітин, визначеними на 1 добу захворювання. Виявлено достовірні позитивні кореляційні зв'язки між вмістом PI⁺-клітин та значеннями шкали NIHSS на 1 день ($r=0,525$, $p=0,040$), дещо слабший прямий зв'язок зі значеннями шкали NIHSS на 7 ($r=0,415$, $p=0,036$) та 14 дні захворювання ($r=0,470$, $p=0,040$).

Не відмічався достовірний кореляційний зв'язок між вмістом ANV⁺-лейкоцитів у периферійній крові та тяжкістю стану хворих на 1 день. Проте ступінь неврологічного дефіциту у пацієнтів прямо залежав від рівня лейкоцитів у апоптозі на 7

($r=0,495$, $p=0,045$) та 14 дні ($r=0,470$, $p=0,037$). Ймовірно, найвищий вміст апоптичних клітин при АТІ може бути однією з причин наростання неврологічної симптоматики, визначеної за шкалою NIHSS на 7 день гострого періоду ІІ. Прямий достовірний зв'язок виявлено між тяжкістю стану хворого на 1 добу захворювання та вмістом АФК⁺-клітин ($r=0,512$, $p=0,042$).

Перспективи подальших досліджень полягатимуть у вивченні про- та антиапоптичних механізмів у гострому періоді різних підтипів ІІ.

Висновки: 1. У гострому періоді різних підтипів ІІ зростає кількість лейкоцитів в апоптозі та некрозі, а також лейкоцитів з підвищеним внутрішньоклі-

тинним вмістом АФК, порівняно з КГ. Рівень АФК⁺ клітин корелює з вмістом ANV⁺- та PI⁺-клітин.

2. Найвищий вміст ANV⁺- та PI⁺-клітин виявлено при АТІ, АФК⁺ – при КЕІ.

3. При тяжкому та дуже тяжкому ІІ виявлено достовірно вищий вміст ANV⁺-, PI⁺- клітин та лейкоцитів з внутрішньоклітинним підвищеним рівнем

АФК, порівняно з легким мозковим інсультом, при середньотяжкому – лише ANV⁺-клітин.

4. Виявлено достовірні позитивні кореляційні зв'язки між вмістом PI⁺ -клітин та тяжкістю ІІ на 1, 7 та 14 дні, ANV⁺- ANV⁺-клітин – на 7 та 14 дні, АФК⁺-клітин – на 1 день захворювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дамбаева С. В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека / С. В. Дамбаева, Д. В. Мазуров, В. В. Пинягин // Иммунология. – 2001. – № 6. – С. 58–61.

2. Мищенко Т. С. Достижения в области сосудистых заболеваний головного мозга за последние 2 года // Здоров'я України. – 2010. – № 5. – С. 12–13.

3. Петрищев Н. Н. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптических клеток в крови больных острым коронарным синдромом / Н. Н. Петрищев, Л. В. Васина, А. В. Луговая // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2008. – Сер. 11, Вып. 1. – С. 14–23.

4. Яворська В. О. Специфічне лікування ішемічного інсульту: нейропротекція / В. О. Яворська, Ю. В. Фломін // Международный неврологический журнал. – № 6 (36). – 2010. – Научный обзор.

5. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / van Engeland M., Nieland L. J., Ramaekers F. C. [et al.] // Cytometry. – 1998. – Vol. 1, № 31(1). – P. 1–9.

6. Baird A. E. A three-item scale for the early prediction of stroke recovery / A. E. Baird, J. Dambrosia, S. Janket // Lancet. – 2001. – № 357. – P. 2095–2099.

7. Baird A. E. Blood genomics in human stroke / Baird A. E. // Stroke. – 2007. – № 38. – P. 694–698.

8. Broughton B. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia / B. Broughton, D. Reutens, C. Sobey // Stroke. – 2009. – № 40. – P. 331–339.

9. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats / Li Y., Chopp, M. Jiang N., Zhang Z. G., Zaloga C. // Stroke. – 1995. – № 26. – P. 1252–1257.

10. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies / A. G. Yakovlev, A. I. Faden // NeuroRx. – 2004. – Vol. 1. – P. 5–16.

11. Apoptosis after experimental stroke; fact or fashion? / J. P. McManus, A. M. Buchan // J. Neurotrauma. – 2000. – № 17. – P. 899–914.

12. Modulation of Apoptosis in Acute Ischemic Stroke as Treatment Challenges / Joaquin Jordan, Laura Moreno-Parrado, David Anton-Martinez [et al.] // Current Immunology Reviews. – 2012. – Vol. 8 (11). – P. 39–49.

13. Love S. Apoptosis and brain ischaemia / S. Love // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2003. – № 27. – P. 267–282.

14. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1 α and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia / Shang-der Chen, Ding-I Yang, Tsu-Kung Lin [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – № 12. – P. 7199–7215.

15. Sairanen T. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke—a possible target of antiapoptotic treatments / T. Sairanen, M. L. Karjalainen-Lindsberg, A. Paetau // Brain. – 2006. – Vol. 129. – P. 189–199.

16. Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke / C. Weimar, A. Ziegler, I. R. Konig, H. C. Diener // J. Neurol. – 2002. – № 249. – P. 888–895.

APOPTOSIS OF THE WHITE BLOOD CELLS IN DIFFERENT SUBTYPES OF ISCHEMIC STROKE IN ACUTE PERIOD

©N. R. Sokhor

SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine»

SUMMARY. The content of leukocytes in blood in apoptosis and necrosis and the level of leukocytes with high level of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry in patients with acute period of ischemic stroke (IS) were studied. The highest content of ANV⁺- and PI⁺-cells were found in patient with atherothrombotic IS and ROS⁺-cells – with cardioembolic IS, the lowest level – in patients with lacunar IS. In severe and very severe IS was significantly higher content of ANV⁺-, PI⁺- and ROS⁺-cells compared with mild stroke, with moderate – only level of ANV⁺-cells.

KEY WORDS: acute period of ischemic stroke, apoptosis, necrosis, reactive oxygen species.