

Стан системи глутатіону у гемолізаті еритроцитів хворих на хронічну ішемію мозку

Демченко А.В.

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя

Резюме. Мета роботи – вивчити систему глутатіону (рівень відновленого глутатіону та активність глутатіонзалежних ферментів) у гемолізаті еритроцитів хворих на хронічну ішемію мозку (ХІМ). Обстежено 287 пацієнтів на ХІМ та 50 здорових осіб без ознак цереброваскулярного захворювання, з використанням клініко-нейропсихологічних, лабораторних та інструментальних методів дослідження. Встановлено достовірне зниження концентрації відновленого глутатіону, зниження активності глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази та підвищення активності глутатіонтрансферази у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ порівняно з аналогічними показниками у здорових осіб. Виявлено негативний кореляційний зв'язок між рівнем відновленого глутатіону та віком пацієнтів ($r=-0,34$, $p<0,0001$), стадією дисциркуляторної енцефалопатії (ДЕ) ($r=-0,50$, $p<0,0001$), товщиною комплексу інтима-медіа сонних артерій ($r=-0,29$, $p=0,009$), рівнем гомоцистеїну ($r=-0,81$, $p<0,0001$), а також рівнем глутатіонпероксидази та стадією ДЕ ($r=-0,39$, $p<0,0001$), рівнем гомоцистеїну ($r=-0,60$, $p<0,0001$).

Ключові слова: дисциркуляторна енцефалопатія, відновлений глутатіон, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза.

Цереброваскулярні захворювання (ЦВЗ) займають провідне місце серед основних причин смертності та інвалідності населення [4,8]. За період 2000-2010 р.р. кількість ЦВЗ в Україні збільшилась з 3,4 до 4,5% [4]. Їх поширеність сталася за рахунок збільшення хронічних, повільно прогресуючих форм ЦВЗ, які позначаються у вітчизняній літературі та клінічній практиці терміном «дисциркуляторна енцефалопатія» (ДЕ). ДЕ – це синдром багатоголищового (дифузного) ураження головного мозку, який обумовлений хронічною судинною мозковою недостатністю та/або повторними епізодами гострих порушень мозкового кровообігу (дисгемія, транзиторна ішемічна атака, інсульт) і характеризується повільним прогресуючим перебігом з розвитком поступово наростаючих дефектів функцій мозку [10].

На сьогодні для науковців актуальним є вивчення молекулярно-біохімічних аспектів розвитку церебральної ішемії та розробка ефективної патогенетично обґрунтованої фармакологічної корекції цієї патології [2]. При ішемії основну роль в ураженні нейронів головного мозку відіграє оксидативний стрес, який виникає в умовах підвищеної продукції активних форм кисню як внутрішньоклітинно, так і поза клітиною. Розвиток оксидантного стресу є результатом порушення рівноваги між продукцією вільних радикалів та активністю антиоксидантних ферментів. У системі антиоксидантного захисту та редокс-залежній регуляції значна роль належить системі глутатіону: відновленому глутатіону (ВГ) та глутатіонзалежним ферментам. За останнє десятиліття виявлені принципово нові особливості участі глутатіонзалежних ферментів: глутатіонтрансферази (ГТ), глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіонредуктази (ГР) в процесах проліферації, апоптозу, фолдинга білка, клітинного сигналіngu [2,12,13,14]. ВГ є важливим внутрішньоклітинним антиоксидантом та відіграє особливу роль у підтримці клітинного редокс-статусу за рахунок участі у тіол-дисульфідному обміні, що забезпечує регуляцію цілого ряду функцій клітини, в першу чергу регуляцію генної експресії, активності окремих ферментів і ферментних систем. Зниження рівня ВГ нижче показників норми може служити індикатором порушення клітинного редокс-статусу [5].

Гомоцистеїн, як і інші тіолові сполуки, має прооксидантну активність, завдяки наявності в його складі тіольних груп (-SH). В основі розвитку оксидантного стресу при гіпергомоцистеїнемії лежать неферментативні окислювально-відновні реакції, які каталізуються іонами металів. В процесі окислення тіольних груп гомоцистеїна утворюються вільні радикали O_2 та H_2O_2 , які ініціюють перекисне окислення ліпідів, що і призводить до пошкодження ендотеліальних клітин і утворення окислених ліпопротеїдів плазми [1,2].

На сьогоднішній день немає єдиного трактування кількісного впливу глутатіону та активності глутатіонзалежних ферментів на організм людини. Різні зміни їх концентрацій внаслідок лікування, як збільшення, так і зменшення, трактуються як позитивні. Глутатіон є

потенційним резервом нейротоксичних амінокислот глутамату і цистеїну, які при ішемії головного мозку беруть участь в ураженні нейронів [11,13]. Важлива роль системи глутатіону у патогенезі ХІМ доведена у ряді клінічних досліджень, але не досліджені його зміни при різних стадіях ДЕ, в залежності від вираженості когнітивних розладів (КР) і стану судинної стінки у хворих на ХІМ.

Мета роботи – вивчити систему глутатіону (рівень відновленого глутатіону та активність глутатіонзалежних ферментів) у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ.

Матеріал і методи обстеження.

Обстежено 287 пацієнтів на ХІМ (основна група), серед них 186 жінок та 101 чоловік. Етіологічними чинниками захворювання були атеросклероз церебральних судин та його поєднання з артеріальною гіпертензією. Середній вік пацієнтів – 55,55±7,81 років. Діагноз формулювався у відповідності до класифікації судинних уражень головного мозку МКХ-Х та підтверджувався даними інструментального і лабораторного обстеження (комп'ютерної томографії/магнітно-резонансної томографії головного мозку, дуплексного сканування брахіоцефальних судин, обстеження очного дна, ліпідного спектру, коагулограми). Серед пацієнтів основної групи: хворих на ДЕ І ст. було 86 (29,96 %), ДЕ ІІ ст. – 129 (44,95 %) та ДЕ ІІІ ст., внаслідок перенесеного інфаркту мозку, – 72 (25,09 %) осіб. Контрольну групу склали 50 клінічно здорових осіб (28 жінок та 22 чоловіка) без ознак ЦВЗ. Середній вік – 53,14±9,17 років.

Проведено нейропсихологічне тестування хворих на ДЕ за допомогою короткої шкали оцінки вищих психічних функцій – Mini Mental State Examination, батареї тестів на лобну дисфункцію, Монреальської шкали когнітивної оцінки.

Для проведення лабораторних досліджень забір крові проводився з ліктьової вени з 8.00 до 9.00 годин ранку натщесерце після 12-годинного утримання від їжі. Концентрацію ВГ у гемолізаті еритроцитів пацієнтів визначали флюорометрично з ортофталевим ангідридом. Активність глутатіонзалежних ферментів у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ визначали спектрофотометрично [9]. Активність всіх досліджуваних ферментів перераховували на г гемоглобину (Hb). Вміст гомоцистеїну визначали імуноферментним методом за допомогою діагностичних наборів “Axis Homocysteine EIA” (United Kingdom).

Дослідження стану брахіоцефальних судин здійснювали за допомогою дуплексно-триплексного сканера LOGIQ C-5 Premium (США).

Результати дослідження оброблені із застосуванням статистичного пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., США, № AXXR712D833214FAN5), а також «Microsoft Excel 2010». Нормальність розподілу показників встановлювали за критерієм Шапіро-Уїлка. Дані описової статистики подано у вигляді середнього арифметичного та стандартного відхилення - $M \pm SD$ або медіани та міжквартильного інтервалу – Me (Q1-Q3) залежно від розподілу ознаки. Порівняння показників трьох незв'язаних вибірок проводили за допомогою непараметричного метода Краскеллу-Уоллісу з подальшим попарним порівнянням груп за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали значимими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення.

В результаті проведеного дослідження встановлено достовірне зниження концентрації ВГ у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ порівняно з цими показником у здорових осіб (табл. 1), що узгоджується з даними літератури [3,7]. Стосовно змін активності антиоксидантних ферментів у хворих на ХІМ в літературі наводяться суперечливі дані, як підвищення активності ГПО та ГТ і зниження ГР [3], так і зниження активності ферментів системи глутатіону у цієї категорії пацієнтів порівняно зі здоровими особами [7]. Так, за нашими даними, встановлено достовірне зниження активності ГР і ГПО та підвищення активності ГТ у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ порівняно з аналогічними показниками у здорових осіб. Активація ГТ при ДЕ пов'язана з накопиченням продуктів пероксидації та оксидативним стресом на фоні гіпоксії внаслідок ішемії [3].

Таблиця 1

Показники вмісту відновленого глутатіону та глутатіонзалежних ферментів у гемолізаті еритроцитів хворих на ДЕ та здорових осіб

Показники	Хворі на ДЕ (n=287)	Здорові особи (n=50)	p
ВГ, ммоль/л	1,90 (1,70-2,20)	2,50 (2,30-2,70)	<0,0001
ГТ, мкмоль/(хв* г Hb)	3,41 (2,17-5,06)	2,36 (1,66-3,59)	0,0002

ГР, мкмоль/(хв* г Нб)	1,69 (1,28-2,00)	1,93 (1,54-2,41)	0,0001
ГПО, ммоль/(хв* г Нб)	16,81 (13,74-20,13)	21,67 (18,21-23,90)	<0,0001

Вміст гомоцистеїну у сироватці крові 137 пацієнтів на ХІМ склав 11,89 (8,00 – 14,76) мкмоль/л. Гіпергомоцистеїнемія (понад 15 мкмоль/л) діагностована у 24,1 % хворих на ДЕ. Встановлена вірогідно ($p < 0,0001$) нижча концентрація ВГ у гемолізаті хворих на ХІМ з гіпергомоцистеїнемією – 1,40 (1,30 – 1,60) ммоль/л порівняно з пацієнтами, у яких був вміст ГЦ нормальний (до 10 мкмоль/л) та високий нормальний (10 – 15 мкмоль/л) – 1,90 (1,80 – 2,10) ммоль/л. Також виявлено достовірне ($p < 0,0001$) зниження активності ГПО у гемолізаті еритроцитів хворих з гіпергомоцистеїнемією – 12,13 (10,93 – 13,42) ммоль/(хв* г Нб) порівняно з пацієнтами, у яких був вміст ГЦ нормальний та високий нормальний і склала 17,32 (15,67 – 20,99) ммоль/(хв* г Нб).

У хворих із гіпергомоцистеїнемією спостерігається більш суттєве зниження активності ГПО, що призвело до зниження рівня ВГ за рахунок його окислення, яке відбувається за участю гомоцистеїну плазми крові. Тим самим ці зміни порушують захисні механізми клітини від оксидативного стресу. Отримані нами результати дослідження узгоджуються і з даними інших авторів [1,2].

У міру прогресування стадій ДЕ (табл. 2) встановлено вірогідне поступове зниження концентрації ВГ та активності ГПО, суттєве зниження активності ГР відмічено лише у хворих на ДЕ 3 ст. Однак, виявлено достовірне підвищення активності ГТ у хворих на ДЕ 2 ст. та ДЕ 3 ст. порівняно з пацієнтами на ДЕ 1 ст. Після проведеного нейропсихологічного тестування у обстежених хворих були виявлені легкі (39,0 %) та помірні (51,9 %) КР. Збережені когнітивні функції спостерігалися лише у 9,1 % осіб. У міру прогресування КР встановлено вірогідне зниження активності ГПО ($p = 0,002$ за Краскеллу-Уоллісом) від 18,20 (14,94-20,20) ммоль/(хв* г Нб) у хворих без КР до 15,85 (12,59-18,50) ммоль/(хв* г Нб) у пацієнтів з помірними КР. А також виявлена достовірно нижча концентрація ВГ у гемолізаті еритроцитів хворих із помірними КР – 1,90 (1,60 – 2,10) ммоль/л порівняно з пацієнтами із легкими КР – 2,00 (1,80 – 2,30) ммоль/л ($p = 0,001$) та без КР – 2,10 (1,90 – 2,30) ммоль/л ($p = 0,003$).

Таблиця 2

Показники вмісту відновленого глутатіону та глутатіонзалежних ферментів у гемолізаті еритроцитів хворих на ДЕ в залежності від стадії

Показники	ДЕ 1 ст.	ДЕ 2	ДЕ 3	p	p	p	p
	(n=86)	ст. (n=12 9)	ст. (n=72)				
ВГ ммоль/л	2,30 (1,90- 2,50)	1,90 (1,80- 2,10)	1,80 (1,50- 2,00)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
ГТ мкмоль/ (хв* г Нб)	2,97 (1,61- 4,15)	3,54 (2,48- 5,22)	3,67 (2,10- 5,12)	> 0,05	0 ,002	0 ,03	> 0,05
ГР мкмоль/ (хв* г Нб)	1,76 (1,53- 1,97)	1,70 (1,29- 2,05)	1,44 (1,07- 1,82)	0 ,004	> 0,05	0 ,001	0 ,02
ГПО ммоль/ (хв* г Нб)	19,22 (16,57- 23,19)	16,46 (13,37- 19,34)	15,05 (12,21- 17,33)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0 ,02

Примітка:

p – вірогідність відмінностей за методом Краскеллу-Уоллісу;

p₁₋₂ – вірогідність відмінностей за тестом Манна-Уїтні (1-а – 2-а стадії ДЕ);

p₁₋₃ – вірогідність відмінностей за тестом Манна-Уїтні (1-а – 3-я стадії ДЕ);

p₂₋₃ – вірогідність відмінностей за тестом Манна-Уїтні (2-а – 3-я стадії ДЕ).

За результатами проведеного дуплексного сканування брахіоцефальних судин потовщення комплексу інтима-медіа (КІМ) понад 0,09 см відмічено у 82 (28,6 %) хворих на ХІМ. У цих пацієнтів виявлена достовірно нижча концентрація ВГ у гемолізаті еритроцитів (табл. 3) та спостерігалася тенденція до зниження активності ГПО.

Шляхом кореляційного аналізу виявлено негативний кореляційний зв'язок між рівнем ВГ та віком пацієнтів ($r=-0,34$, $p<0,0001$), стадією ДЕ ($r=-0,50$, $p<0,0001$), товщиною КІМ артерій судин ($r=-0,29$, $p=0,009$), рівнем ГЦ ($r=-0,81$, $p<0,0001$); рівнем ГПО та віком пацієнтів ($r=-0,19$, $p=0,001$), стадією ДЕ ($r=-0,39$, $p<0,0001$), товщиною КІМ сонних артерій ($r=-0,14$, $p=0,02$), рівнем ГЦ ($r=-0,60$, $p<0,0001$).

Таблиця 3

Показники вмісту відновленого глутатіону та глутатіонзалежних ферментів у гемолізаті еритроцитів хворих на ДЕ в залежності від товщини КІМ

Показники	До 0,09 см (n=205)	Понад 0,09 см (n=82)	
ВГ ммоль/л	2,00 (1,80-2,30)	1,85 (1,60-2,10)	,0003
ГТ мкмоль/(хв* г Нб)	3,38 (2,13-4,97)	3,46 (2,30-5,10)	0,05
ГР мкмоль/(хв* г Нб)	1,69 (1,28-1,99)	1,70 (1,28-2,02)	0,05
ГПО ммоль/(хв* г Нб)	17,04 (13,88- 20,72)	16,23 (12,59-19,03)	,053

Таким чином, проведене дане клініко-лабораторне та інструментальне дослідження розширило уявлення про патогенетичні молекулярно-біохімічні аспекти ХІМ. Важливу роль у розвитку та прогресування стадій ДЕ відіграють порушення у системі глутатіону у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ. Тому, на сьогодні лабораторна діагностика з визначенням стану антиоксидантного захисту у пацієнта на ХІМ є актуальною та дозволяє вибір ефективної, патогенетично обґрунтованої фармакологічної корекції патологічних змін у системі глутатіону у цієї категорії пацієнтів із застосуванням нейрометаболічних препаратів з антиоксидантною дією.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено достовірне зниження концентрації ВГ, зниження активності ГР і ГПО та підвищення активності ГТ у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ порівняно з аналогічними показниками у здорових осіб.

2. У міру прогресування стадій ДЕ встановлено вірогідне поступове зниження концентрації ВГ та активності ГПО у гемолізаті еритроцитів хворих на ХІМ. Суттєве зниження активності ГР відмічено лише у хворих на ДЕ 3 ст. Також виявлено достовірне підвищення активності ГТ у хворих на ДЕ 2 ст. та ДЕ 3 ст. порівняно з пацієнтами на ДЕ 1 ст.

3. У міру прогресування КР встановлено вірогідне зниження активності ГПО, виявлено достовірно нижча концентрація ВГ у гемолізаті еритроцитів хворих із помірними КР порівняно з пацієнтами із легкими КР і збереженими когнітивними функціями.

4. У пацієнтів на ДЕ із потовщенням КІМ сонних артерій (понад 0,09 см) виявлена достовірно нижча концентрація ВГ у гемолізаті еритроцитів порівняно із хворими з нормальною товщиною КІМ сонних артерій.

Состояние системы глутатиона в гемолизате эритроцитов больных с хронической ишемией мозга

Демченко А.В.

Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье

Резюме. Цель работы – изучить систему глутатиона (уровень восстановленного глутатиона и активность глутатионзависимых ферментов) в гемолизате эритроцитов больных с хронической ишемией мозга (ХИМ). Обследовано 287 пациентов с ХИМ и 50 здоровых лиц без

признаков цереброваскулярного заболевания, с использованием клинико-нейропсихологических, лабораторных и инструментальных методов исследования. Установлено достоверное снижение концентрации восстановленного глутатиона, снижение активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы и повышение активности глутатионтрансферазы в гемолизате эритроцитов больных с ХИМ в сравнении с аналогичными показателями здоровых лиц. Выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнем восстановленного глутатиона и возрастом пациентов ($r=-0,34$, $p<0,0001$), стадией дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) ($r=-0,50$, $p<0,0001$), толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий ($r=-0,29$, $p=0,009$), уровнем гомоцистеина ($r=-0,81$, $p<0,0001$), а также уровнем глутатионпероксидазы и стадией ДЭ ($r=-0,39$, $p<0,0001$), уровнем гомоцистеина ($r=-0,60$, $p<0,0001$).

Ключевые слова: дисциркуляторная энцефалопатия, восстановленный глутатион, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза.

Glutathione system state in a hemolysate of erythrocytes among the patients with chronic cerebral ischemia

Demchenko A.V.

Zaporizhian state medical university, Zaporizhzhya city

Summary. *The purpose of the work is to study a glutathione system (level of reduced glutathione and activity of glutathione-dependent enzymes) in a hemolysate of erythrocytes among the patients with chronic cerebral ischemia (CCI).*

It was examined 287 patients with CCI and 50 healthy people without any signs of cerebrovascular disease using clinical and neuropsychological, laboratory and instrumental methods of investigation. It was established a significant decrease of the reduced glutathione concentration, the decrease of glutathione reductase and glutathione peroxidase and the increase of glutathione transferase activity in a hemolysate of erythrocytes among the patients with chronic cerebral ischemia in comparison with these rates among healthy people. It was established a negative correlated connection between the level of the reduced glutathione, the age of the patients ($r=-0,34$, $p<0,0001$), the stage of discirculatory encephalopathy (DE) ($r=-0,50$, $p<0,0001$), intima media complex thickness of carotid arteries ($r=-0,29$, $p=0,009$), the level of homocysteine ($r=-0,81$, $p<0,0001$) and also the level of glutathione peroxidase, the stage of DE ($r=-0,39$, $p<0,0001$) and homocysteine level ($r=-0,60$, $p<0,0001$).

Key words: *discirculatory encephalopathy, reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione transferase.*

Література

1. Абрамова Е.А. Роль гомоцистеина плазмы крови в развитии сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа : автореферат ... к.мед.н. Москва, 2009. – 25с.
2. Беленичев И.Ф. Нейропротекция и нейропластичность / И.Ф. Беленичев, В.И. Черний, Е.А. Нагорная и др. – К.: Логос, 2015. – 512 с.
3. Верлан Н.В. Фармакологическая коррекция мексидолом свободно-радикальных процессов у больных дисциркуляторной энцефалопатией // Н.В. Верлан, Т.В. Бараховская, Л.С. Колесниченко // Вестник Бурятского госуниверситета. – 2010. - №12. – С. 11 – 14.
4. Зозуля І.С. Епідеміологія цереброваскулярних захворювань в Україні / І.С. Зозуля, А.І. Зозуля // Український медичний часопис. - 2011. - №5(85). – С. 38-41.
5. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299 – 348.

6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. –2009. – Т. 55, Вып. 3. – С. 255–277.
7. Лемешко Е.Х. Система глутатиона и ее коррекция у больных хронической ишемией мозга и сахарным диабетом второго типа легкой и средней степени тяжести / Е.Х. Лемешко, Л.С. Колесниченко, Н.В. Верлан др. // Сибирский медицинский журнал. – 2010. - №6. – С. 72 – 74.
8. Свиридова Н.К. Стратегия лечения когнитивных расстройств при хронической ишемии мозга и начальных проявлениях недостаточности кровоснабжения мозга / Н.К. Свиридова, Н.П. Павлюк // Східно-Європейський неврологічний журнал. – 2015. - №5. – С. 27 – 32.
9. Чекман И.С. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных лекарственных средств первичной и вторичной нейропротекции. Методические рекомендации / И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев, Е.А. Нагорная и др. – К.: ООО «Издательство «Юстон», 2016. – 82 с.
10. Шмидт Е. В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга / Е. В. Шмидт // Журнал неврологии и психиатрии. – 1985. – № 9. – С. 1281–1288.
11. Cutler R.G. Oxidative stress and aging: catalase is a longevitydeterminant enzyme / R.G. Cutler // Rejuvenation. Res. – 2005. – Vol. 8. – P.138-140.
12. Galano A. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals / A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy // RSC Advances. – 2011. N 1. – P. 1763–1771.
13. Zimmerman C. Antioxidant status in acute stroke patients and patients at stroke risk / C. Zimmerman, K. Winnefeld, S. Streck et al. // Eur. Neurol. – 2004. – Vol. 51, № 3. – P.157-161.
14. Wu B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // Trends in Pharmacological Sciences. – 2012. - N 33. – P. 656 – 668.

Опубліковано:

Демченко А. В. Стан системи глутатіону у гемолізаті еритроцитів хворих на хронічну ішемію мозку / А. В. Демченко // Східно-європейський неврологічний журнал. – 2016. - № 4. – С. 30-36.