

УДК 612.015.39: 576.311.347-02:616.831-005.1-036.6

Х. В. Дуве

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЧНИХ ЗМІН У ХВОРИХ У ВІДНОВНОМУ ТА РЕЗИДУАЛЬНОМУ ПЕРІОДАХ АНЕВРИЗМАЛЬНОГО СУБАРАХНОЇДАЛЬНОГО КРОВОВИЛИВУ

Х. В. Дуве

Особенности метаболических изменений у пациентов в восстановительном и резидуальном периодах аневризмального субарахноидального кровоизлияния

K. V. Duve

The peculiarities of metabolic changes in patients in recovery and residual periods of aneurysmal subarachnoid haemorrhage

Метою цієї роботи було дослідження показників апоптозу, некрозу, мітохондріальної дисфункції та окисного стресу у пацієнтів в ранньому та пізньому відновному та резидуальному періодах аневризмального субарахноїдального крововиливу (аСАК). Було обстежено 82 пацієнти, поділених за віком, статтю, катамнезом, формою перенесеного крововиливу, локалізацією аневризми та методом оперативного втручання. Методом проточної цитофлуориметрії було встановлено підвищення вмісту лейкоцитів у апоптозі та некрозі у 2,88 та 1,96 разів. У 2,17 разів відбулось збільшення кількості лейкоцитів зі зниженим мітохондріальним трансмембранним потенціалом та у 2,82 — вмісту внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК). У пацієнтів різного віку та клініко-анатомічної форми перенесеного крововиливу вірогідної різниці показників виявлено не було. Проте у групах, поділених за статтю, терміном після захворювання, локалізацією розірваної аневризми, а також методом оперативного втручання було отримано вірогідні різниці показників. Отже, вірогідно вищими показники апоптозу були у жінок. Мітохондріальна дисфункція переважала у відновному періоді. У пацієнтів, що мали ендovasкулярний тип оперативного втручання, показники АФК були вищими, порівняно з групою неоперованих хворих. Показники апоптозу були вірогідно вищими при вертебробазиллярній локалізації аневризми.

Ключові слова: аневризма, субарахноїдальний кроволив, апоптоз, некроз, окисний стрес, мітохондріальна дисфункція

Целью данного исследования было изучение показателей апоптоза, некроза, митохондриальной дисфункции и окислительного стресса у пациентов в раннем и позднем восстановительном и резидуальном периодах аневризмального субарахноидального кровоизлияния (аСАК). Было обследовано 82 пациента, разделенных по возрасту, полу, катамнезу, форме перенесенного кровоизлияния, локализации аневризмы и методу оперативного вмешательства. Методом проточной цитофлуориметрии было установлено повышение уровня лейкоцитов в апоптозе и некрозе в 2,88 и 1,96 раза. В 2,17 раза произошло увеличение количества лейкоцитов с пониженным митохондриальным трансмембранным потенциалом и в 2,82 — содержания внутриклеточных активных форм кислорода (АФК). У пациентов разного возраста и клинико-анатомической формы перенесенного кровоизлияния достоверной разницы показателей выявлено не было. Однако в группах, разделенных по полу, сроку после заболевания, локализации разорванной аневризмы, а также методу оперативного вмешательства, были получены достоверные различия показателей. Таким образом, достоверно выше показатели апоптоза были у женщин. Митохондриальная дисфункция преобладала в восстановительном периоде. У пациентов, имевших эндovasкулярный тип оперативного вмешательства, показатели АФК были выше по сравнению с группой неоперированных больных. Показатели апоптоза были достоверно более высокими при вертебробазиллярной локализации аневризмы.

Ключевые слова: аневризма, субарахноидальное кровоизлияние, апоптоз, некроз, окислительный стресс, митохондриальная дисфункция

The aim of this study was to explore the indicators of apoptosis, necrosis, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in patients in early and late recovery and residual periods of aneurysmal subarachnoid haemorrhage (aSAH). We examined 82 patients, divided them into groups according to age, sex, catamnesis, hemorrhage form, aneurysm localization and surgical treatment method. By the method of flow cytometry we defined the elevation of white blood cells (WBC) in apoptosis and necrosis — by 2,88 and 1,96 times. The level of WBC with reduced mitochondrial membrane potential increased by 2,17 and the level of reactive oxygen species (ROS) was higher by 2,82 times. The statistically reliable difference was absent in patients of different age and hemorrhage form. But in groups which were divided due to sex, catamnesis, aneurysm localization and surgical treatment method we received statistically reliable results. Significantly higher indicators of apoptosis were observed in the female group. Mitochondrial dysfunction was higher in recovery period. Patients, who underwent endovasculary surgery method showed higher level of ROS than those who had not any surgical treatment. Those who had vertebrobasilar localization of aneurysm showed significantly higher apoptosis level.

Keywords: aneurysm, subarachnoid haemorrhage, apoptosis, necrosis, oxidative stress, mitochondrial dysfunction

Частота аневризмального субарахноїдального крововиливу (аСАК) складає 10,5 випадків на 100 тис. населення на рік, а смертність сягає 50 % [1].

Згідно з даними Nieuwkamp D. J. (2009), через 12 місяців після аСАК частка пацієнтів, що не потребує сторонньої допомоги, складає від 36 до 55 %. Вважається, що серед населення Європи 3 % мають аневризму, що не розірвалась [2]. Розповсюдження крові, яка вилілась в результаті розриву аневризми, спричиняє механічне пошкодження нейронів та глії, в результаті чого відбувається викид нейротрансмітерів, порушується функція мітохондрій та мембранної деполаризації і, як наслідок, сповільнюється метаболізм, виникає клітинний набряк чи некроз. Вторинний каскад ушко-

джень запускається внаслідок дії продуктів коагуляції та розпаду гемоглобіну, що активує мікроглію, вже через 4 години після ушкодження, і яка, насамперед, вивільняє продукти, що спричинюють порушення гематоенцефалічного бар'єра, індукують вазогенний набряк та апоптоз у тканинах мозку [3, 4].

Вже через 24 години після початку аСАК відбувається запуск низки патологічних механізмів, процесів апоптозу та некрозу. В ранньому пошкодженні мозку значну роль відіграють також оксидативний стрес, дизрегуляція оксиду азоту, генерація матриксної металопротеїнази-9 (MMP-9), активація інтерлейкіну-1 бета (IL-1β). Порушення балансу між активними формами кисню (АФК) та антиоксидантною системою призводить до неспроможності останньої елімінувати надлишок АФК, це передусім, веде до пошкодження мітохондрій

та до ще більшого вивільнення АФК, і спричинює каскад пошкоджень у клітині [5].

Дисбаланс, що сприяє відкриттю мітохондріальних мегаканалів та продукції АФК під час САК, вивчався у багатьох наукових дослідженнях [6—8]. Отже, багато факторів, як-от глобальна ішемія, порушення мікроциркуляції, токсичність субарахноїдальної крові, беруть участь у низці механізмів, які відбуваються при аСАК [9—15].

Дедалі частіше вивчаються предиктори сприятливого виходу пацієнтів із аСАК, з'являються поодинокі наукові публікації, що висвітлюють наявність проявів відтермінованого апоптозу, а саме апоптозу у відновному і резидуальному періодах аСАК [16]. Літературні дані, що стосуються метаболічних зрушень у резидуальному періоді аСАК, є суперечливими та нечисленними. Недостатньо вивчені взаємозв'язки між клінічними показниками гострого періоду аСАК з наступним ступенем вираженості процесів апоптозу, некрозу, окисного стресу та мітохондріальної дисфункції у відновному та резидуальному періодах захворювання.

Тому метою цього дослідження стало: вивчити особливості процесів апоптозу і некрозу, внутрішньоклітинного окисного стресу та мітохондріальної дисфункції у відновному та резидуальному періодах аСАК.

Обстежено 82 пацієнти у відновному та резидуальному періодах аСАК, з них — 54 (65,85 %) чоловіки, 28 (34,15 %) жінок. Середній вік пацієнтів становив $(45,93 \pm 1,07)$ років. Виокремлювали пацієнтів двох вікових категорій: молодого — 32 (39,03 %) та середнього віку — 50 (60,97 %). За катамнезом захворювання хворі були поділені на 4 групи: до року — I група, 2—5 років — II група, 5—10 років — III група, та більше ніж 10 років — IV група. До уваги брали локалізацію розірваної аневризми (каротидна — 64 (78,05 %) чи вертебробазиллярна — 18 (21,95 %)), а також тип оперативного втручання. Пацієнтів після ендovasкулярного виключення аневризми було 41 (50 %), кліпування — 19 (23,17 %), та неоперованих — 22 (26,82 %). За клініко-анатомічною формою перенесеного аСАК виокремили такі групи пацієнтів: з субарахноїдальним кроволивом (САК) було 35 (42,68 %), субарахноїдально-паренхіматозним (СПК) — 24 (29,27 %), субарахноїдально-вентрикулярним (СВК) — 15 (18,29 %) та субарахноїдально-паренхіматозно-вентрикулярним (СПВК) — 8 (9,76 %). Групу контролю (КГ) склали 20 здорових осіб, репрезентативних за віком та статтю.

Проводили загальноприйняте клініко-неврологічне обстеження, оцінювали індекс активності повсякденної життєдіяльності (індекс Бартел), враховували тяжкість аСАК в дебюті (за шкалою Hunt-Hess, шкалою ком Глазго).

Дослідження показників апоптозу, мітохондріальної дисфункції, внутрішньоклітинного окисного стресу здійснено цитофлуориметричним методом за допомогою проточного цитофлуориметра Epics XL («Beckman Coulter», США). Кількість лейкоцитів периферичної крові в стадії апоптозу (ANV⁺-клітини) і некрозу (PI⁺-клітини) визначено за допомогою реагентів ФІТЦ-мічений аннексин V з набору реагентів «ANNEXIN V FITC» («Beckman Coulter», США). Кількість лейкоцитів зі зниженим рівнем мітохондріального трансмембранного потенціалу (МТП) (JC-1⁺-клітини) визначали з використанням набору «MitoScreen» («BD Pharmingen», США). Кількість лейкоцитів периферичної крові з підвищеним рівнем внутрішньоклітинних АФК (АФК⁺-клітин) визначали з використанням дихлорфлуоресцеїну діацетату (ДФХ-ДА) («Sigma Aldrich», USA). Отримані параметри виражали у відсотках до кількості всіх лейкоцитів.

Оброблення отриманих даних проводили у програмі Microsoft Excel 2011 та з допомогою комп'ютерної системи статистичного аналізу Statistica 10.

Вміст лейкоцитів у апоптозі та некрозі у загальній вибірці перевищував показники КГ у 2,88 та 1,96 разів (табл. 1). У 2,17 разів відбулось підвищення кількості лейкоцитів зі зниженим МТП та у 2,82 — вмісту внутрішньоклітинних АФК (табл. 2).

Таблиця 1. Вміст лейкоцитів периферичної крові в стадії апоптозу (ANV⁺-клітини) і некрозу (PI⁺-клітини) у загальній вибірці

Показник	Хворі з аСАК (n = 82)	КГ (n = 20)
ANV ⁺ -клітини, %	34,26 ± 1,12	11,91 ± 0,34*
PI ⁺ -клітини, %	2,39 ± 0,10	1,22 ± 0,13*

Примітка. Тут і далі: * — показники вірогідні порівняно з КГ ($p < 0,01$)

Таблиця 2. Вміст лейкоцитів периферичної крові зі зниженим рівнем МТП (JC-1⁺-клітини) та з підвищеним рівнем внутрішньоклітинних АФК у загальній вибірці

Показник	Хворі з аСАК (n = 75)	КГ (n = 20)
АФК ⁺ -клітини, %	38,89 ± 0,82	13,80 ± 2,06*
JC-1 ⁺ -клітини, %	16,37 ± 0,33	7,55 ± 0,99*

Нами знайдено пряму залежність між вмістом АФК⁺-клітин з ANV⁺-клітин ($r = 0,826, p = 0,000$), PI⁺-клітин ($r = 0,515, p = 0,000$), що свідчило про вплив внутрішньоклітинного окисного стресу на активацію процесів апоптозу. Спостерігалися прямі кореляції між кількістю JC-1⁺-клітин з рівнем лейкоцитів у стадії апоптозу ($r = 0,612, p = 0,000$) та некрозу ($r = 0,594, p = 0,000$). Отримані дані вказували на залежність апоптотичних процесів від функціональної активності мітохондрій. Отримано прямий взаємозв'язок між вмістом JC-1⁺-клітин з кількістю АФК⁺-клітин ($r = 0,659, p = 0,000$), що підтверджувало думку про те, що підвищення внутрішньоклітинних АФК є результатом зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу.

У пацієнтів різних вікових груп не встановлено вірогідної різниці у показниках апоптозу, некрозу, вмісту АФК та клітин зі зниженим МТП. У пацієнтів молодого віку встановлено помірну обернену залежність між кількістю ANV⁺- та PI⁺-клітин з катамнезом захворювання ($r = -0,398, p = 0,024$) та ($r = -0,350, p = 0,049$). Це вказувало на те, що процеси апоптозу та некрозу після перенесеного аСАК у молодому віці перебігають більш інтенсивно у відновному періоді, ніж у резидуальному.

Аналізуючи досліджувані показники залежно від статі, отримано вірогідно вищі показники ANV у жінок — $(35,83 \pm 1,84)$ % проти $(33,44 \pm 1,41)$ % у чоловіків. При докладному аналізі встановлено, що у хворих жіночої статі рівень апоптозу корелював із наявністю ускладнень у гострому періоді ($r = 0,403, p = 0,033$) та з локалізацією аневризми у вертебробазиллярному басейні ($r = 0,375, p = 0,049$).

У разі поділу пацієнтів за катамнезом захворювання вірогідно вищий рівень JC-1⁺-клітин було отримано у пацієнтів I групи порівняно з IV групою $(17,11 \pm 0,64)$ % проти $(15,15 \pm 0,72)$ %. Це вказувало на переважання мітохондріальної дисфункції у відновному періоді поряд з процесами апоптозу та некрозу.

Нами виявлено вірогідно вищі показники АФК⁺-клітин у групі пацієнтів з ендovasкулярним методом виключення аневризми, порівняно із групою неоперованих хворих (41,71 ± 1,84 % проти 38,10 ± 1,58 %, при $p < 0,01$). У неоперованих пацієнтів виявлено залежність між ступенем порушення свідомості у гострому періоді аСАК з вмістом AnV⁺-клітин ($r = 0,444$, $p = 0,038$).

Щодо локалізації розірваної аневризми, встановлено, що показники апоптозу, некрозу та мітохондріальної дисфункції були вищими у пацієнтів з вертебробазиллярною локалізацією аневризми, аніж з каротидною (табл. 3).

Таблиця 3. Вміст PI⁺ та AnV⁺, JC-1 та АФК залежно від локалізації аневризми

Локалізація аневризми	Каротидна	Вертебробазиллярна
Кількість пацієнтів, <i>n</i> , %	64 (78,05 %)	18 (21,95 %)
AnV ⁺ -клітини, %	33,24 ± 1,25*	37,88 ± 2,35* $p_{1-2} \leq 0,01$
PI ⁺ -клітини, %	2,32 ± 0,12*	2,62 ± 0,20*
JC-1 ⁺ -клітини, %	16,49 ± 0,37*	16,00 ± 0,70*
АФК ⁺ -клітини, %	38,63 ± 0,93*	39,72 ± 1,81*

Примітка: * — вірогідність різниці показника порівняно з КГ ($p \leq 0,01$). p_{1-2} — вірогідна різниця між певними групами

У групі з III ступенем тяжкості за шкалою Hunt-Hess некроз корелював з локалізацією розірваної аневризми ($r = 0,552$, $p = 0,014$), а саме був вищим у тих пацієнтів, які мали аневризму у вертебробазиллярному басейні.

Клініко-анатомічна форма по-різному впливала на досліджувані явища. Зокрема, у групі пацієнтів з САК — з найвищими показниками апоптозу та некрозу, встановлено пряму залежність між вмістом клітин у стадії апоптозу від тяжкості крововиливу у гострому періоді за шкалою Hunt-Hess ($r = 0,418$, $p = 0,012$). У хворих з СВК показники AnV⁺ та PI⁺ корелювали з катамнезом захворювання ($r = -0,580$, $p = 0,023$) та ($r = -0,526$, $p = 0,044$), відповідно. В цій групі спостерігалась залежність між вмістом внутрішньоклітинних АФК та оцінкою за шкалою Бартел ($r = -0,552$, $p = 0,021$). У хворих з СПВК отримано зворотні кореляційні зв'язки між рівнем АФК⁺- та JC-1⁺-клітин зі ступенем порушення свідомості у гострому періоді ($r = -0,900$, $p = 0,006$), ($r = -0,806$, $p = 0,029$).

Результати проведених досліджень дозволяють зробити такі висновки.

У пацієнтів у відновному та резидуальному періодах аСАК відбуваються мітохондріальна дисфункція, внутрішньоклітинний окисний стрес, апоптоз та некроз лейкоцитів крові, що проявляється вірогідним збільшенням кількості JC⁺-, АФК⁺-, ANV⁺-, та PI⁺-клітин (вміст лейкоцитів у апоптозі та некрозі перевищував норму у 2,88 та 1,96 разів, у 2,17 разів відбулось підвищення кількості лейкоцитів зі зниженим МТП та у 2,82 — вмісту внутрішньоклітинних АФК).

На вираженість метаболічних змін впливала стать хворих, катамнез захворювання, тяжкість стану у гострому періоді, тип оперативного втручання у гострому періоді, локалізація аневризми, тип крововиливу.

У відновному періоді аСАК вираженість апоптозу та мітохондріальної дисфункції були вірогідно вищими, ніж у резидуальному. При ендovasкулярному методі виключення аневризми вміст АФК⁺-клітин був вищим, порівняно з групою неоперованих хворих (41,71 ± 1,84 %

проти 38,10 ± 1,58 %, $p < 0,01$). Вірогідно вищими показники апоптозу були при вертебробазиллярній локалізації аневризми порівняно з каротидною ($p \leq 0,01$).

Список літератури

1. Grasso G., Alafaci C., Macdonald R. L. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: State of the art and future perspectives // *Surgical Neurology International*. 2017; 8: 11. doi: 10.4103/2152-7806.198738.
2. Risk of rupture of an intracranial aneurysm based on patient characteristics: a case-control study / [Vlak M. H., Rinkel G. J., Greebe P., Algra A.] // *Stroke*. 2013. Т. 44. No. 5. С. 1256—1259.
3. Aronowski J., Hall C. E. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from preclinical studies // *Neurol Res*. 2005; 27: 268—79.
4. Intracranial Hemorrhage — Mechanisms of Secondary Brain Injury / Lok J., Leung W., Murphy S. [et al.] // *Acta Neurochirurgica Supplement*. 2011; 111: 63—69.
5. Qu J., Chen W., Hu R., Feng H. The Injury and Therapy of Reactive Oxygen Species in Intracerebral Hemorrhage Looking at Mitochondria // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Vol. 2016, Article ID 2592935. doi: 10.1155/2016/2592935.
6. Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage / Gaetani P., Pasqualin A., Baena R. [et al.] // *J Neurosurg*. 1998; 89: 748—754.
7. Cerebrospinal fluid superoxide dismutase and serum malondialdehyde levels in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: preliminary results / Kaynar M. Y., Tanriverdi T., Kemerdere R. [et al.] // *Neurol Res*. 2005; 27: 562—567.
8. Antioxidant status and alpha1-antitrypsin activity in subarachnoid hemorrhage patients / Marzatico F., Gaetani P., Tartara F. [et al.] // *Life Sci*. 1998;63:821—826.
9. Глоба М. В., Мороз В. В., Векслер В. В. Особливості перебігу церебрального вазоспазму при розривах артеріальних аневризм вертебрально-базиллярного басейна // *Матеріали IV з'їзду нейрохірургів України, м. Дніпропетровськ, 27—30 травня 2008 р.* С. 175.
10. Особенности течения внутричерепных кровоизлияний из разорвавшихся артериовенозных мальформаций / [Л. А. Дзяк, К. В. Митрофанов, Е. В. Миззякина, Е. С. Цуркаленко] // *Патология*. 2009. Т. 6, № 3. С. 40—48.
11. Apoptotic Mechanisms for Neuronal Cells in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage / Hasegawa Y., Suzuki H., Sozen T. [et al.]. In: *Early Brain Injury or Cerebral Vasospasm* / Feng H., Mao Y., Zhang J. H. (eds) // *Acta Neurochirurgica Supplements*. 2011. Vol. 110/1. P. 43—8.
12. Matz P. G., Copin J. C., Chan P. H. Cell death after exposure to subarachnoid hemolysate correlates inversely with expression of CuZn-superoxide dismutase // *Stroke*. 2000; 31: 2450—1.
13. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage / Park S., Yamaguchi M., Zhou C. [et al.] // *Ibid*. 2004; 35: 2412—4.
14. Prunell G. F., Svendgaard N.-A., Alkass K., & Mathiesen T. Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain // *Journal of Neurosurgery*. 2005. 102(6), 1046—1054. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.102.6.1046>.
15. Sehba, F. A., Pluta, R. M., & Zhang, J. H. Metamorphosis of Subarachnoid Hemorrhage Research: from Delayed Vasospasm to Early Brain Injury // *Molecular Neurobiology*. 2011. 43 (1), 27—40. URL : <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8155-z>.
16. Interference of apoptosis in the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage / Palade C., Ciurea A. V., Nica D. A. [et al.] // *Asian Journal of Neurosurgery*. 2013; 8(2): 106—111. doi:10.4103/1793-5482.116389.
17. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis / Nieuwkamp D. J., Setz L. E., Algra A. [et al.] // *The Lancet Neurology*. 2009. Т. 8. No. 7. С. 635—642.

Надійшла до редакції 04.04.2018 р.

ДУВЕ Христіна Володимирівна, асистент кафедри неврології Державного вищого навчального закладу «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України», м. Тернопіль, Україна; e-mail: duve.khrystyna@gmail.com

DUVE Khrystyna, Assistant of Neurology Department of the State Higher Educational Institution "I. Ya. Horbachevskyi's Ternopil State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine", Ternopil, Ukraine; e-mail: duve.khrystyna@gmail.com