

## СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА — КОНОВАЛОВА

Работа посвящена тяжелому нейродегенеративному наследственному заболеванию, при котором нарушается баланс между поступлением и экскрецией меди. При БВК избыточная свободная токсическая медь в основном откладывается в таких органах-мишенях как печень и структуры головного мозга.

Анализ полученных данных показал, что при БВК выраженные нейродегенеративные и некротические процессы проходят в основном в органах мишенях, где концентрируется большое количество свободной токсической меди, и особенно в печени и различных структурах головного мозга. В таких же отделах как слизистая оболочка ротовой полости некоторое повышение концентрации меди, с учетом гормезисного эффекта, может наоборот стимулировать процессы роста и пролиферации клеток и ускорять обмен популяции клеток буккального эпителия.

*Ключевые слова:* болезнь Вильсона — Коновалова (БВК), медь, мозг, гетерохроматин, нейродегенерация, апоптоз, старение.

Болезнь Вильсона — Коновалова (БВК) — тяжелое, наследственное, аутосомно-рецессивное заболевание, в основе которого лежит нарушение метаболизма меди. Развитие заболевания определяет ген АТР7В, который расположен на длинном плече 13 хромосомы и кодирует трансмембранный белок АТФ-азу Р-типа, который встраивает молекулу меди в апоцерулоплазмин и осуществляет выделение меди в желчь [10, 26].

Дефект АТФ-азы приводит к тому, что свободные ионы меди после «переполнения» буферных систем печени начинают поступать в кровотоки и избыточно накапливаются в головном мозге, особенно в его базальных ганглиях [11, 23]. По мере накопления меди в структурах головного мозга преневрологическая стадия заболевания переходит в неврологическую с развитием различных неврологических и психопатологических симптомов и синдромов, а также и развитию колец Кайзера — Флейшера.

БВК относится к группе нейродегенеративных заболеваний, которой в последнее время в неврологии уделяется большое внимание. Это обусловлено тем, что в структуре неврологической патологии нейродегенеративные заболевания занимают значительное место, являясь основной причиной деменции и различных расстройств движений, что приводит к быстрой инвалидизации этих больных.

В основе развития этих заболеваний лежат нарушения метаболизма и изменение конформации клеточных белков в определенных группах нейронов. При нейродегенеративных заболеваниях страдают преимущественно нейроны и глиальные клетки базальных ганглиев и стволовых структур мозга, которые вырабатывают такие жизненно важные нейромедиаторы как ацетилхолин, дофамин и серотонин [8].

Этим заболеваниям присуща определенная эндогенность, а также, к сожалению необратимость и прогрессирование патологического процесса, приводящего к инвалидизации и к смерти. Гибель мозга и проблема его старения зависят от генетической заложенности в конкретном индивидууме.

Процесс старения — закономерность общебиологическая. Это изменение структуры и снижение функции органов и тканей. Структурно-функциональная инволютивная перестройка органов и тканей в значи-

тельной мере связана с апоптозом, клеточным некрозом и реактивным глиозом. Общебиологической тенденцией является и более высокий темп старения самцов и соответственно их меньшая продолжительность жизни. Более медленный темп старения самок принято объяснять их большей толерантностью к ассоциирующимся с возрастом заболеваниям, высокой эффективностью их репарационных систем, а также меньшей интенсивностью метаболизма [4, 5, 7, 13].

Божков А. И. с соавт. (2012) предлагает гормезисную модель возможности регуляции темпов старения. Он отмечает, что темп старения определяется реактивностью и памятью метаболических систем и имеет гормезисную природу. В связи с этим возникает вопрос о соотношении календарного и биологического возраста при различных состояниях человека [13].

Структурные изменения при старении обусловлены апоптозом запрограммированной гибелью клетки, что поддерживает баланс тканевого гомеостаза. При ускоренном апоптозе происходит диспропорция между пролиферацией клеток и их гибелью. «Для каждой клетки есть время жить, и есть время умирать» [2, 15, 19].

В развитии апоптоза задействованы митохондрии и ядро. Наиболее характерными морфологическими изменениями при апоптозе являются агрегация хроматина, а также фрагментация ядра и цитоплазмы с образованием апоптотических телец, которые быстро фагоцитируются макрофагами без воспалительной реакции. Имеется много индукторов и супрессоров апоптоза. Обычная клетка, кроме опухолевых, стволовых и зародышевых, способна пережить около 50—100 митотических делений, после чего клетка гибнет [20, 22, 24, 25]. Свойства клетки, как части целого организма, изменяются с изменениями, происходящими в физиологическом состоянии организма.

Согласно экспериментальным данным установлено, что универсальным и ранним событием, после которого клетка необратимо вступает на путь апоптоза является снижение величины ее электрохимического потенциала [15].

Следует отметить, что наряду с молекулярно-генетическими и нейрорхимическими маркерами апоптоза клеток и нейронов в рамках нейродегенеративного процесса имеются еще и морфологические и биоэлектрические признаки. К ним относят уменьшение объема цитоплазмы и ядра, гиперхроматоз ядра и цитоплазмы,

а также изменение биоэлектрического потенциала клеточного ядра [14, 21].

Как известно, хроматин может быть представлен либо в деконденсированной, функционально активной форме эухроматина, либо в функционально неактивной форме гетерохроматина. Соотношение этих форм зависит от функционального состояния клетки. Состояние хроматина может изменяться и при действии на клетку различных внешних факторов. Данные последних лет свидетельствуют, что проблема возрастной конденсации хроматина весьма важна для выяснения ключевых механизмов старения организма на уровне клетки [12, 17].

На основании проведенных Ю. Г. Шкорбатовым и В. Г. Шахбазовым с соавт. (2001) исследований были получены результаты, свидетельствующие о том, что наблюдаемые при изменении состояния ядра процессы конденсации хроматина связаны со снижением электрического заряда ядер, процессы деконденсации — с увеличением заряда. Увеличение количества гетерохроматина в ядре клетки свидетельствует о снижении систем репарации генетических повреждений клетки [16].

Ю. Г. Шкорбатов (2001) содержание гетерохроматиновых гранул (СГГ) определял в клетках буккального эпителия, полученных соскобом с внутренней поверхности щеки донора. Клетки окрашивали 2% раствором орсеина в 45% уксусной кислоте и исследовали при увеличении  $\times 700$ . Содержание СГГ определял в 30 интерфазных ядрах с расчетом средних величин. В группе здоровых доноров 20—29 лет средняя величина СГГ составила  $15,4 \pm 1,0$ ; в группе доноров 50—59 лет и 60—79 лет СГГ было значительно повышено: соответственно  $23,9 \pm 1,0$  и  $23,2 \pm 1,1$ . На основании полученных результатов он считает, что процессы гетерохроматизации и снижения функциональной активности хроматина отражают процессы старения клетки и организма [16].

Используя этот метод, Н. П. Волошина с соавт. (2010) обследовала 63 больных рассеянным склерозом (РС) со средним возрастом 35,5 лет и нашла достоверное повышение количества содержания гетерохроматиновых гранул у этих больных. Если у больных РС показатель величины СГГ достиг  $25,8 \pm 0,45$ , то в контрольной группе такого же возраста, этот показатель составил лишь  $17,8 \pm 0,25$ . На основании этих данных авторы пришли к выводу, что у больных РС процессы гетерохроматизации и снижение функциональной активности хроматина ядер клеток идут более ускоренным темпом, чем у здоровых людей, и их биологический возраст опережает хронологический [6].

Для определения влияния гиперкупреоза у пациентов с БВК на процессы общего старения организма нами обследовано 32 больных, из них женщин — 11 человек и мужчин — 21 человек. На период обследования средний возраст больных составил  $31,7 \pm 8,43$  лет. Возрастной диапазон больных был от 20 лет до 50 лет. 12 больных обследовано в динамике.

Возраст больных к появлению первых симптомов заболевания составил в среднем  $26,0 \pm 7,12$  лет, с колебаниями от 15 до 49 лет. Время от появления первых симптомов заболевания до постановки окончательного диагноза, а следовательно и начала этиопатогенетической

терапии, составило в среднем 2,8 года и колебалось от 1 до 7 лет. Длительность заболевания была от 1 года до 15 лет и в среднем составила  $9,2 \pm 2,3$  года.

Диагноз БВК устанавливался или подтверждался в клинике института на основании наличия колец Кайзера — Флейшера, снижения содержания в сыворотке крови церулоплазмينا ниже 20 мг/дл и увеличения экскреции меди с мочой более чем 100 мкг/сутки.

Анализ клинической картины у обследованных нами больных выявил полиморфную, разной степени выраженности неврологическую симптоматику с преобладанием поражения подкорковых базальных структур больших полушарий головного мозга. В зависимости от ведущих неврологических симптомов, согласно классификации Коновалова (1960), больные были распределены следующим образом: наибольшее количество больных (14) имели дрожательную форму заболевания. У 9 больных была дрожательно-ригидная форма БВК у 6 больных была экстрапирамидно-корковая форма заболевания. У 2 больных была брюшная форма, а у 1 больного аритмогиперкинетическая (ранняя) форма. У большинства (75%) больных в статусе отмечались кольца Кайзера — Флейшера [9].

Группа контроля была составлена из 24 пациентов, у которых не было никаких признаков, связанных с повреждением центральной нервной системы. Возраст обследуемых контрольной группы находился в пределах 20—42 года и в среднем составил  $31,1 \pm 3,12$  года.

Содержание гетерохроматиновых гранул в ядрах клеток буккального эпителия определяли методом Ю. Г. Шкорбатова (2001) [18].

Результаты проведенных исследований показали, что у пациентов с БВК имеется достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение количества содержания гетерохроматиновых гранул. Если в контрольной группе величина СГГ составила  $16,0 \pm 0,7$  гранул неактивного гетерохроматина в одном ядре, то у пациентов с БВК этот показатель составил лишь  $11,1 \pm 0,7$ .

На рисунке представлена гистограмма распределения здоровых испытуемых (обоих полов) и больных БВК (обоих полов) по величинам СГГ. Как видно из рисунка, в диапазоне от 6 до 10 гранул функционально неактивного конденсированного хроматина (гетерохроматина) в одном ядре находились лишь пациенты с БВК. В диапазоне 11—16 гранул находились пациенты как с БВК, так и пациенты контрольной группы, а в диапазоне от 17 до 22 гранул были лишь пациенты контрольной группы.



Распределение здоровых испытуемых и больных БВК по величинам содержание гетерохроматиновых гранул

Гендерный анализ полученных данных показал, что у здоровых мужчин имеется тенденция к более высокому содержанию гетерохроматиновых гранул в ядрах буккального эпителия, чем у здоровых женщин. У пациентов с БВК гендерных различий по содержанию функционально неактивного конденсированного хроматина выявлено не было. Также не было отмечено и зависимости между формой БВК и содержанием гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия.

При повторном обследовании после проведенного курса медьэлиминирующей терапии количество гетерохроматиновых гранул в ядрах клеток буккального эпителия несколько повышалось и в среднем по группе БВК составило  $13,7 \pm 0,8$  гранул.

При анализе полученных нами данных обращает внимание тот факт, что у пациентов с БВК показатели содержания гетерохроматиновых гранул в клетках буккального эпителия достоверно ниже, чем у пациентов контрольной группы. В то время как по данным литературы, содержание гетерохроматиновых гранул в ядрах клеток буккального эпителия у больных с другими дегенеративными заболеваниями были достоверно выше, чем в соответствующих контрольных группах [6, 17].

Таким образом, полученные нами данные могут говорить о том, что при БВК в определенный период развития и течения болезни идет не угнетение процессов роста и пролиферации клеток буккального эпителия, а наоборот — стимуляция этих процессов.

В пользу данного предположения говорят и данные литературы о том, что недостаточность меди приводит к ускорению процесса старения митохондрий клеток организма и повышению концентрации холестерина и триглицеридов в крови [1]. Поэтому повышение концентрации меди в крови, очевидно, может стимулировать процессы роста и пролиферации клеток. Об этом говорит и некоторое повышение у наших больных комплексного фактора регуляции митоза клетки до 4,39 ед. при контроле 3,78—3,94 ед.

Следовательно, при БВК выраженные нейродегенеративные и некротические процессы проходят в основном в органах мишенях, где концентрируется большое количество свободной токсической меди, и особенно — в печени и различных структурах головного мозга. В таких же отделах как слизистая оболочка ротовой полости некоторое повышение концентрации меди, с учетом гормезисного эффекта, может стимулировать процессы роста и пролиферации клеток и ускорять обмен популяции клеток буккального эпителия.

Так как медь является одним из важнейших незаменимых микроэлементов, необходимых для жизнедеятельности человека, а отсюда и ее участие во многих метаболических процессах, можно предположить, что при БВК гиперкупреоз происходит по гормезисному типу (постепенное нарастание в организме свободной токсической меди). Поэтому в различных системах и структурах человеческого организма могут быть неодинаковые, как по выраженности так и направленности, патологические и физиологические воздействия ионов меди.

Возможно, этим можно объяснить и многообразие проявлений БВК, частое отсутствие параллелизма тяжести печеночных и неврологических проявлений заболевания, а также большой латентный период клинических проявлений.

## Список литературы

1. Микроэлементы человека: этиология, классификация, органопатология / [Авцын А.П., Жаворонкова А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С.]. — М.: Медицина, 1991. — С. 35.
2. Ащеулова Т. В. Дистанційні маркери апоптозу при артеріальній гіпертензії / Т. В. Ащеулова, О. М. Ковалева // Журнал АМН України. — 2007. — № 2. — С. 319—326.
3. Гормезисная модель метаболической памяти и возможности регуляции темпов старения [Божков А.И., Никитченко Ю.В., Сидоров В.И. и др.] // Проблемы старения и долголетия. — 2012. — Т. 21, № 3. — С. 245—254.
4. Вайсерман А. М. Определение биологического возраста *Drosophila melanogaster* / А. М. Вайсерман // Там же. — 1993. — Т. 3, № 1. — С. 9—14.
5. Войтенко В. П. Половые различия в старении и смерти человека / В. П. Войтенко // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Общие проблемы биологии. — 1987, № 6. — С. 64—105.
6. Волошина Н. П. Состояние хроматина в ядрах клеток буккального эпителия как маркер биологического возраста у больных рассеянным склерозом / Н. П. Волошина, Ю. Г. Шкорбатов, И. К. Гапонов // Український неврологічний журнал. — 2010. — № 2 (15). — С. 9—14.
7. Воробьев П. А. Тромбоцитарно-эндотелиальные взаимодействия — теория старения и горизонты геропротекции / П. А. Воробьев // Клиническая геронтология. — 2001. — Т. 7, № 12. — С. 3—8.
8. Иллариошкин С. Н. Ранняя диагностика нейродегенеративных заболеваний / С. Н. Иллариошкин // Журнал «Нервы». — 2008. — № 1. — С. 6—8.
9. Коновалов Н. В. Гепатоцеребральная дистрофия. — М.: Медицина, 1960. — 555 с.
10. Крайнова Т. А. Церулоплазмин. Биологические свойства и клиническое применение / Т. А. Крайнова, Л. М. Ефремова. — Н. Новгород: НГМА, 2000. — 31 с.
11. Аутоантитела к белкам нервной ткани при гепатолентикулярной дегенерации / [Морозов С. Г., Усанова М. П., Полещук В. В. и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. — 2001, № 10. — С. 37—39.
12. Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом / А. А. Прокофьева-Бельговская. — М.: Наука, 1986/ — 431 с.
13. Репин В. С. Стволовые клетки и старение: идеи и реальности / В. С. Репин // Клиническая геронтология. — 2001. — Т. 7, № 12. — С. 29—36.
14. Стойка Р. С. Чому і як відмирають клітини тканин і органів? / Р. С. Стойка, О. О. Фильченко, Б. Р. Стойка // Біополімери й клітка. — 1997. — № 13. — С. 352—61.
15. Фильченко А. А. Апоптоз и рак / А. А. Фильченко, Р. С. Стойка. — Киев: Морион, 1999. — 180 с.
16. О роли изменений состояния хроматина и биологических свойств ядер в реакции клеток на внешние воздействия / [Ю. Г. Шкорбатов, В. Г. Шахбазов, А. О. Руденко, М. Болнассан] // Труды по фундаментальной и прикладной генетике. — Харьков, 2001. — С. 128—140.
17. Шкорбатов Ю. Г. Структура хроматина и состояние организма человека / Ю. Г. Шкорбатов, Л. Журавлева и др. // Cell. Biol. International. — 2005. — № 29. — P. 77—81.
18. Шкорбатов Ю. Г. Изменение степени компактизации хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека под действием высокой и низкой положительной температуры инкубации / Шкорбатов Ю. Г., Шахбазов В. Г., Журавлева Л. А. // Труды по фундаментальной и прикладной генетике (К 100-летию юбилею генетики). — 2001. — С. 289—291.
19. Role of apoptosis in reperfusion injury / [F. Eefting, B. Rensing, J. Wigman et al.] // Cardiovasc. Res. — 2004. — Vol. 61. — P. 414—426.
20. Fossil M. Telomerase and the aging cell implications for human health / M. Fossil // JAMA. — 1998. — V. 279. — P. 1732—1735.
21. Combination of tumor necrosis factor-alpha ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knock-out mice / [Z. Kassiri, G. Y. Oudit, O. Sancher et al.] // Circ. Res. — 2005. — V. 97. — P. 380—390.
22. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts / [S. Kostins, L. Pool, A. Elsasser et al.] // Circ. Res. — 2003. — V. 92. — P. 715—724.



23. Novel mutations of the ATP7B gene in Japanese patients with Wilson disease / [Kusuda Y., Hamaguchi K., Mori T. et al.] // *J. Hum. Genet.* — 2000. — 45.

24. Sabbah H.N. Apoptotic cell death in heart failure / H.N. Sabbah // *Cardiovasc. Res.* — 2000. — V. 45. — P. 704—712.

25. Trauth B.C. Cell Death in Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods / B.C. Trauth J. Keesey // Mannheim: Boehringer

Manheim. — 1995. — P. 34—62.

26. Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells / [Tsvikovskii R., Eisses J.F., Kaplan J.H., Lutsenko S.] // *J. of Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — № 2. — P. 976—983.

Надійшла до редакції 28.03.2013 р.

**I. К. Волошин-Гапонов**

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології  
НАМН України» (м. Харків)

#### Стан хроматину в клітинах букального епітелію у пацієнтів з хворобою Вільсона — Коновалова

Робота присвячена вивченню важкого нейродегенеративного спадкового захворювання, при якому порушується баланс між надходженням і екскрецією міді. При хворобі Вільсона — Коновалова (ХВК) надлишкова вільна токсична мідь в основному відкладається в таких органах-мішенях як печінка і структури головного мозку.

Аналіз отриманих даних показав, що при ХВК виражені нейродегенеративні та некротичні процеси проходять в основному в органах мішенях, де концентрується велика кількість вільної токсичної міді, і особливо в печінці, а також різних структурах головного мозку. У таких же відділах як слизова оболонка ротової порожнини деяке підвищення концентрації міді, з урахуванням гормезисного ефекту, може стимулювати процеси росту і проліферації клітин і прискорювати обмін популяції клітин букального епітелію.

**Ключові слова:** хвороба Вільсона — Коновалова (ХВК), мідь, мозок, гетерохроматин, нейродегенерація, апоптоз, старіння.

**I. K. Voloshyn-Gaponov**

State institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology  
of the NAMS of Ukraine" (Kharkiv)

#### Chromatin conditions in buccal epithelial cells in patients with Wilson's disease

The study deals with a severe neurodegenerative hereditary disease with a disorder of a balance between copper supplying and excretion. In Wilson's disease (WD) an abundant free toxic copper is accumulated mainly in such target organs as liver and brain structures.

An analysis of data obtained has demonstrated that in WD prominent neurodegenerative and necrotic processes proceed mainly in the target organs in which a great amount of a free toxic copper is concentrated, especially in liver and various brain structures. In such areas as a mucous membrane of oral cavity a something higher copper concentration, taking into account the hormesis effect, can on the contrary stimulate processes of cell growth and proliferation and accelerate an exchange of the buccal epithelial cell population.

**Key words:** Wilson's disease, copper, brain, heterochromatin, neurodegeneration, apoptosis, ageing.

УДК 616.89—008.434.5-06:616.831-005.4-085.21

**Г. М. Завгородня**, доцент кафедри лікувальної фізкультури, спортивної  
медицини та реабілітації  
Харківська медична академія післядипломної освіти (м. Харків)

### ДОСВІД МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ КОРЕКЦІЇ ПОСТІНСУЛЬТНИХ АФАЗІЙ

Досліджені динамічні клінічні особливості помірних моторних афатичних синдромів у 28 хворих в ранньому відновному періоді півкульного ішемічного інсульту. Згідно обраного протоколу дослідження мовних функцій ми оцінювали спонтанну мову, автоматизовану мову, дезавтоматизовану мову, повторну мову, називання предметів, розуміння мови (слів, значення слів, малочастотних слів, інструкцій та речень, простих та складних логікограматичних конструкцій). Відмічена більш виражена позитивна динаміка мовних статусів цих хворих на фоні застосування препарату комплексної нейрометаболічної та нейропротективної дії — семаксу.

**Ключові слова:** постінсультна афазія, корекція, семакс

Системні мовні порушення (афазії) внаслідок ішемічного інсульту є другим за поширеністю постінсультним дефектом після рухових порушень з частотою близько 20—25 %, вони значно обмежують комунікативні можливості хворих, їхню повсякденну життєву активність, сприяють їх соціальній ізоляції [2, 9]. Окрім занять з логопедом при афазіях, як когнітивних порушеннях, показані препарати нейрометаболічного спрямування [8]. У досить неоднозначній роботі проф.

Московко С. П. [6], яка підійняла цілу низку складних і актуальних дискусійних питань, підкреслює важливе зауваження щодо суті призначення ноотропів як підсилювачів когнітивних функцій та процесу когнітивної реабілітації у більш широкому сенсі. Окрім цього робиться акцент на поєднанні курсу ноотропної терапії із конкретними завданнями для розвитку когнітивної функції.

В монографії Бекетова А. І. та співавт. [1] представлені церебральні ефекти нейротропних лікарських засобів, нейрометаболічних препаратів, різних комбінацій церебропротекторів при порушеннях мозкового кровообігу, зокрема препарату семакс. Семакс зазначений як універсальний адаптоген, якому притаманні нейромодуляторні, нейротрофічні та нейропротективні властивості як в гострому, так і у відновному періодах інсульту.

У нашому дослідженні оцінена ефективність реабілітації хворих з післяінсультними афатичними синдромами, яка включала проведення логокорекції у поєднанні з призначенням препарату комплексної нейрометаболічної та нейропротективної дії — семаксу. В результаті тривалих досліджень і численних дослідів під керівництвом акад. І. П. Ашмаріна

© Завгородня Г. М., 2013