

мендації [Текст] / М. Я. Головенко. – Київ: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

#### References

1. Varakin, Ju. (2007). Profilaktika insul'tov [Profilaktika insul'tov]. *Medicina neotlozhnyh sostojanij*, 2 (9), 98–103.
2. Gusev, E. I. (2001). Ishemija golovno mozga [Ishemija golovno mozga]. Moscow: Medicina, 328.
3. Kaplan, P. (2003). Rehabilitation of Stroke [Rehabilitation of Stroke]. London, United Kindom: Butterworth of Heinemann, 180.
4. Jarosh, A. S. (2014). Sovremennoe sostojanie problemy ostryh narushenij mozgovogo krovoobrashhenija [Sovremennoe sostojanie problemy ostryh narushenij mozgovogo krovoobrashhenija]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 3 (47), 17–20.
5. Geyer, J. D., Gomez, C. R. (2009). Stroke. A practical approach [Stroke. A practical approach]. New York, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 361.

6. Karzin, A. V. (2003). Osobennosti infuzionnoj terapii pri ostryh zabolevanijah i povrezhdenijah golovno mozga, soprovozhdajushhihsja vnutricherepnymi krovoizlijanijami [Osobennosti infuzionnoj terapii pri ostryh zabolevanijah i povrezhdenijah golovno mozga, soprovozhdajushhihsja vnutricherepnymi krovoizlijanijami]. Nauchno-Issledovatel'skij Institut imeni Sklifosovskogo, Moscow, 129.

7. McGraw, C. P. (1977). Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils. *Archives of Neurology*, 34 (6), 334–336. doi: 10.1001/archneur.1977.00500180028006

8. Buresh, Ja., Bureshova, O., H'juston, D. (1991). Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedenija [Metodiki i osnovnye jeksperimenty po izucheniju mozga i povedenija]. Moscow: Vysshaja shkola, 527.

9. Golovenko, M. Ja. (2002). Eksperimental'ne vivchennja nootropnoi aktivnosti farmakologichnih spoluk [Eksperimental'ne vivchennja nootropnoi aktivnosti farmakologichnih spoluk: metod. rekomendacii]. Kyiv, Ukraine: DFC MOZ Ukraini, 26.

*Рекомендовано до публікації д-р мед. наук, професор Кобеляцький Ю. Ю.  
Дата надходження рукопису 15.05.2015*

**Семененко Андрій Ігорович**, кандидат медичних наук, доцент, кафедра хірургії № 1, курс анестезіології і реанімації, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018  
E-mail: Semenenko05@gmail.com

УДК: 616.831-005.1/4-06:612.015.1  
DOI: 10.15587/2313-8416.2015.45158

## АКТИВНІСТЬ КАСПАЗИ-3 ТА КАТЕПСИНУ Д ПРИ РІЗНИХ ПІДТИПАХ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

© Н. Р. Сохор, С. І. Шкробот, О. Ю. Бударна, О. Р. Ясній

*У 232 хворих гострому періоді різних підтипів ішемічного інсульту (ІІ) спостерігалася мітохондріальна дисфункція, апоптоз та некроз лейкоцитів крові, які були найбільш вираженими при атеротромботичному ішемічному інсульті (АТІ). При АТІ протягом першого тижня зростала активність катепсину Д, що свідчило і про лізосомальний шлях активації апоптозу при даному підтипі ІІ. Найвища активність каспази-3, яка не корелювала з кількістю клітин у стадії апоптозу, виявлена при лакунарному інсульті (ЛІ), що пов'язано з переважним впливом каспази-3 на ендотелій та підвищення проникливості ГЕБ*

**Ключові слова:** гострий період ішемічного інсульту, апоптоз, каспаза-3, катепсин Д

**Aim of research** is defining the dynamics of activity of caspase-3, cathepsin D, apoptosis of leukocytes at the different subtypes of ischemic stroke (IS) in an acute period.

**Methods.** There were examined 232 patients in an acute period of IS: 56 (24,1 %) - with hemodynamic (HDS), 62 (2,7 %) - with atherothrombotic (ATS), 60 (25,9 %) - with cardioembolic (CES) і 54 (23,3 %) - with lacunar stroke (LS). There was defined the number of leukocytes at the stage of apoptosis (ANV+-cells), necrosis (PI+-cells), with an increased content of the active forms of oxygen (AFO+-cells) and with lowered mitochondrial potential (Mito+-cells), activity of caspase-3 and cathepsin D.

**Results.** It was established that at all subtypes of IS mitochondrial dysfunction, apoptosis and necrosis of leukocytes are observed on the 1st day it were presented in increase of content of ANV+-, PI+-, AFO+- and Mito+-cells and were the mostly apparent at ATS. The highest activity of caspase-3 on the 1st day was noticed at LS it did not correlate with a number of cells at the stage of apoptosis and probably was connected with a predominant impact of caspase-3 on endothelium and with hyperpermeability of hematoencephalic barrier. In patients with ATS an activity of cathepsin D increased during the 1st week of disease that can indicate an activation of lysosomal way of activation of apoptosis that courses parallel to an apoptosis connected with mitochondrial dysfunction.

**Conclusions.** The different ways of apoptotic cellular death that depends on subtype of stroke activate in an acute period of IS

**Keywords:** acute period of ischemic stroke, apoptosis, caspase-3, cathepsin D

### 1. Вступ

Експериментальні дослідження інсульту вказують, що окислювальний стрес є одним з основних факторів, що сприяє ішемічному церебральному пошкодженню [1]. Ішемія головного мозку викликає два основні шляхи апоптозу: внутрішній, що полягає в запуску мітохондріального цитохрому С і пов'язаної з ним стимуляції каспази-3, і зовнішній шлях – активація клітинних поверхневих рецепторів смерті, в результаті стимуляції каспази-8 [2].

Каспази пов'язані з небажаною запрограмованою клітинною загибеллю в рамках патофізіології декількох нейродегенеративних захворювань та ішемічного інсульту (ІІ) [3]. Каспаза-3 розглядається в якості основної апоптичної ефекторної протеази, яка бере участь у мозковій ендотеліальній цитотоксичності під час гіпоксії з подальшою реоксигенацією. На тваринних моделях ІІ була продемонстрована активація каспази-3 протягом перших годин після ішемії, а також показана виражена нейропротекторна дія після застосування інгібіторів каспаз [4].

Окрім каспазозалежного апоптозу, все більше доказів вказує на існування інших механізмів загибелі клітини, при яких активація каспаз та інші маркери класичного апоптозу повністю відсутні [5]. Велика кількість некаспазних протеаз, таких як лізосомальні катепсини, відіграють важливу роль у інсульт-індукованій клітинній смерті при ІІ. Катепсин Д має подвійне місце локалізації: в органелах (цитоплазма, лізосоми і фагосоми), а також секретується в екстрацелюлярному матриці. Він бере участь у ряді фізіологічних процесів, включаючи проліферацію клітин і апоптоз [6, 7], а також у розвитку атеросклерозу [8].

### 2. Обґрунтування дослідження

Таким чином, дані літератури свідчать про наявність різних механізмів клітинної загибелі у гострому періоді ІІ. Проте, при цьому не враховується гетерогенність ІІ. Відсутність даних про особливості та шляхи активації процесів апоптозу при різних підтипах ІІ обумовили проведення даного дослідження для виявлення нових мішеней для терапевтичних впливів.

### 3. Мета роботи

Визначити динаміку активності каспази-3, катепсину Д та апоптозу лейкоцитів крові у гострому періоді різних підтипів ІІ.

### 4. Матеріали і методи

Обстежено 224 хворих з різними підтипами ІІ, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в інсультному відділенні Тернопільської обласної комунальної клінічної психоневрологічної лікарні. Гемодинамічний ішемічний інсульт (ГДІ) діагностовано у 54 (24,1 %), атеротромботичний (АТІ) – у 60 (26,7 %), кардіоемболічний (КЕІ) – у 62 (25,9 %) та лакунарний (ЛІ) – у 52 (23,3 %) хворих. ІІ в каротидному басейні спостерігався – у 201 (89,7 %), у вертебробазиллярно-

му – у 23 (10,3 %) пацієнтів. Вік хворих склав від 45 до 75 років (в середньому (59,4±3,7) р.). Частка чоловіків становила 131 (58,5 %), жінок – 93 (41,5 %). Тяжкість стану хворих та ступінь неврологічного дефіциту визначалася на 1-шу та 7-му добу за шкалою NIHSS, відповідно до якої легкий ІІ діагностовано у 69 (30,8 %), середньо тяжкий – у 94 (42,0 %) та тяжкий – у 61 (27,2 %) хворого.

Кількість лейкоцитів периферичної 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 флюоресцеїнізотіоціонатом (Annexin A5-FITC), пропідій йодид (PI) і зв'язуючий буфер. Анексин V застосовували для виявлення клітин, які вступили в апоптоз (ANV<sup>+</sup>-клітини), пропідій йодид (PI) – в якості маркера клітинного некрозу (PI<sup>+</sup>-клітини). Рівень внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК) (необхідно пояснення аббревіатури) у крові вивчали за допомогою проточної цитофлуориметрії з використанням дихлорфлюоресцеїну діацетату («Sigma Aldrich», USA). Значення досліджуваного параметру виражали у відсотках (кількість лейкоцитів з підвищеним внутрішньоклітинним вмістом АФК (АФК<sup>+</sup>-клітини) до кількості клітин з нормальним вмістом АФК). Кількість клітин зі знизеним рівнем потенціалу мітохондріальних мембран (Mito<sup>+</sup>-клітини) проводили за допомогою реактиву Mito Capture™ Mitochondrial Apoptosis Detection Fluorometric Kit («Biovision», США). Активність каспази-3 визначали за допомогою «Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit» (BioSource, США). Порушення стабільності лізосомальних мембран у гострому періоді ІІ вивчено за допомогою аналізу активності катепсину Д: загальної та вільної за модифікованим методом Dingle J. T. (1971) [9]. Контрольну групу (КГ) склали 34 особи, репрезентативні за віком і статтю по відношенню до хворих з ІІ.

Статистичну обробку отриманих результатів виконано за допомогою пакету статистичного аналізу IBMSPSS Statistics. Порівняння вибірок здійснено із застосуванням критерію Стьюдента (t) та коефіцієнту кореляції Пірсона (r).

### 5. Результати дослідження

Нами встановлено, що на 1-шу добу при всіх підтипах ІІ у порівнянні з КГ достовірно зростав вміст ANV<sup>+</sup>-, PI<sup>+</sup>-, АФК<sup>+</sup>- та Mito<sup>+</sup>-клітин (p<0,05) (табл. 1). Показники КГ становили: ANV<sup>+</sup> – (5,12±0,65) %, PI<sup>+</sup> – (0,13±0,03) %, АФК<sup>+</sup> – (12,1±2,04) % та Mito<sup>+</sup>-клітини (4,52±0,25) %. Найбільш виражена мітохондріальна дисфункція виявлена при АТІ, що проявлялося найвищим рівнем лейкоцитів крові у стадії апоптозу та некрозу поряд зі зростанням вмісту Mito<sup>+</sup>-клітин. При КЕІ виявлена найвища генерація внутрішньоклітинних АФК. Найменш виражені процеси мітохондріальної дисфункції спостерігалися при ЛІ.

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

Тип II	Показник				
	ANV <sup>+</sup> -клітини	PI <sup>-</sup> -клітини	АФК <sup>+</sup> -клітини	Mito <sup>+</sup> -клітини	
KEI (n=60)	1	29,24±1,12	1,92±0,11	39,12±2,86	13,23±0,53
	2	31,75±1,99	1,76±0,16	34,65±2,64	12,75±1,25
ГДІ (n=56)	1	27,86±1,29	1,86±0,13	35,68±2,13	13,67±0,56
	2	28,81±2,59	1,50±0,15*	29,91±2,91	11,00±0,54*
АТІ (n=62)	1	32,51±2,35	2,08±0,17	35,21±3,11	15,33±0,74
	2	29,42±1,39	1,61±0,17	28,62±1,15*	12,00±0,27*
ЛІ (n=54)	1	24,25±1,93	1,61±0,13	30,71±2,55	12,00±0,35
	2	25,10±0,12	1,67±0,10	31,45±1,25	11,71±0,34

Примітки: 1 – 1-ша доба; 2 – 7-ма доба; \* – показники достовірно у порівнянні з 1-ою добою

На 7-му добу відмічалася практично однакова інтенсивність апоптичних процесів при KEI та АТІ.

Аналіз активності каспази-3 показав її достовірне зростання у гострому періоді II (p<0,05), що склало (8,75±0,68) у порівнянні з КГ – (2,42±0,326) пмоль/мг білка.

Проаналізовано активність каспази-3 при різних підтипах II (табл. 2).

Таблиця 2  
Активність каспази-3 на 1-шу добу при різних підтипах II (M±m), пмоль/мг білка

Тип II	Активність каспази-3
KEI (n=60)	7,14±1,45
ГДІ (n=56)	10,07±1,77
АТІ (n=62)	11,47±1,22
ЛІ (n=54)	15,10±0,27

Встановлено, що при ЛІ активність каспази-3 була достовірно вищою, ніж при інших підтипах II (p<0,05), при KEI – достовірно нижчою (p<0,05), ніж при ЛІ та АТІ, а при ГДІ – достовірно відрізнялася лише від показників хворих з ЛІ. При KEI та ГДІ активність каспази-3 достовірно не відрізнялася між собою.

На 7-му добу відмічено достовірне (p<0,05) зниження активності каспази-3 в цілому в обстежуваних пацієнтів у порівнянні з 1-ою добою, що склало (5,84±0,83) пмоль/мг білка. Але, не зважаючи на це, активність каспази-3 залишалася достовірно (p<0,05) вищою, ніж у КГ.

При аналізі динаміки активності каспази-3 при різних підтипах II виявлено, що достовірне її зниження спостерігалось при ЛІ та ГДІ та було відсутнє при АТІ (рис. 1). При АТІ на 7-му добу спостерігалися найвищі значення каспази-3 (достовірно вищі, ніж при ЛІ та KEI (p<0,05)).

При вивченні активності катепсину Д у гострому періоді II було діагностовано достовірно (p<0,05) вищі показники у порівнянні з КГ. У КГ показники загальної активності (ЗА) катепсину Д склали (0,42±0,08), вільної активності (ВА) – (0,17±0,05) нмоль тирозину/(хв.\*мг білка). На 1-шу добу II ЗА та

ВА катепсину Д була вищою, ніж у КГ: (3,42±0,21) та (2,31±0,19) нмоль тирозину/(хв.\*мг білка) відповідно. На 7-му добу в середньому спостерігалось деяке зниження ЗА та ВА, проте недостовірне у порівнянні з вихідними значеннями: (3,16±0,31) та (1,64±0,39) нмоль тирозину/(хв.\*мг білка). По відношенню до значень КГ показники хворих з II на 7-му добу залишалися достовірно вищими (p<0,05).

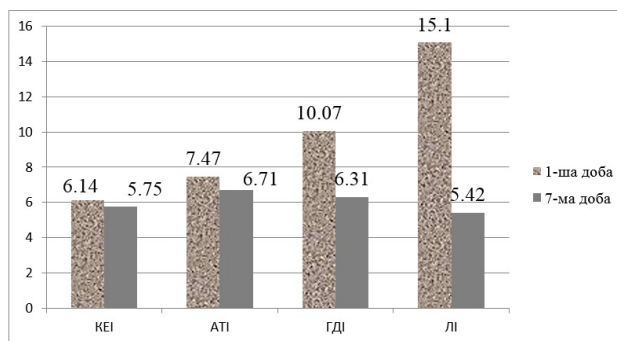


Рис. 1. Динаміка активності каспази-3 при різних підтипах II

Проаналізовано динаміку ЗА та ВА катепсину Д при різних підтипах II (табл. 3).

Таблиця 3  
Динаміка активності катепсину Д у хворих з різним типом II, нмоль тирозину/(хв.\*мг білка) (M±m)

Тип II	Доба інсульту			
	1-ша		7-ма	
	ЗА	ВА	ЗА	ВА
KEI (n=60)	3,66±0,66	2,25±0,44	2,69±0,29	1,32±0,20*
АТІ (n=62)	1,47±0,49	0,93±0,36	2,96±0,21*	2,09±0,50*
ГДІ (n=56)	4,46±0,87	3,34±0,37	3,91 ±0,36	1,94±0,42*
ЛІ (n=54)	1,10±0,04	0,20±0,08	2,81±0,13*	1,88±0,07*

Примітка: \* – показники достовірно відрізняються по відношенню до показників 1-ої доби (p<0,05)

Виявлено залежність ЗА та ВА катепсину Д на 1-шу та 7-му добу інсульту від патогенетичного підтипу II. ЗА та ВА катепсину Д на 1-шу добу була найвищою при ГДІ, достовірно відрізняючись від значень хворих з АТІ та ЛІ. На 7-му добу ГДІ спостерігалось достовірне зниження ВА катепсину Д у порівнянні з 1-ою добою (p<0,05).

При KEI на 1-шу добу II достовірно (p<0,05) вища активність катепсину Д виявлена по відношенню до хворих з АТІ та ЛІ. На 7-му добу KEI у порівнянні з 1-ою добою виявлено достовірне зниження ВА катепсину Д.

При АТІ в дебюті захворювання спостерігалась достовірно нижча по відношенню до KEI та ГДІ ЗА та ВА катепсину Д. Проте на 7-му добу ЗА і ВА достовірно (p<0,05) зростала у порівнянні з 1-ою добою.

При ЛІ на 1-шу добу інсульту ЗА катепсину Д була достовірно ( $p < 0,05$ ) нижчою, ніж при КЕІ та ГДІ і достовірно не відрізнялася у порівнянні з АТІ. ВА катепсину Д при цьому інсульті була достовірно ( $p < 0,05$ ) нижчою у порівнянні з іншими хворими. На 7-му добу захворювання при ЛІ виявлено достовірне ( $p < 0,05$ ) зростання як ЗА, так і ВА катепсину Д по відношенню до вихідних значень.

#### 6. Обговорення результатів дослідження

Результатами нашого дослідження встановлено, що на 1-шу добу при всіх підтипах ІІ має місце апоптоз та некроз лейкоцитів крові, внутрішньоклітинний оксидантний стрес та мітохондріальна дисфункція. Найбільш виражена мітохондріальна дисфункція виявлена при АТІ, що може бути пов'язано зі старшим віком таких хворих та більшою важкістю інсульту. Крім того, апоптоз безпосередньо приймає участь в атеросклерозі мозкових судин. Встановлено, що роль апоптозу в атерогенезі є подвійною, в залежності від стадії бляшки: у ранніх стадіях, апоптоз клітин гладких м'язів і запальних клітин, таких як лімфоцити і макрофаги, може затримати розвиток атеросклеротичного процесу. Проте на пізніх стадіях він приводить до розриву бляшки і тромбозу та сприяє виникненню АТІ [10]. Найменш виражені процеси мітохондріальної дисфункції та найменша кількість лейкоцитів у стадії апоптозу спостерігалися при ЛІ.

Аналіз динаміки кількості ANV<sup>+</sup>-клітин засвідчив, що на 7-му добу інсульту відмічалася практично однакова інтенсивність апоптичних процесів при КЕІ та АТІ. На наш погляд, значну роль при цьому відіграє мітохондріальна дисфункція, зумовлена пригніченням синтезу АТФ за рахунок зниження мітохондріального потенціалу, накопиченням іонів Са у клітинах, генерацією внутрішньоклітинних АФК. Вважається, що раннє збільшення виробництва АФК мітохондріями при реперфузії є одним з початкових факторів, що спричиняє мітохондріальну дисфункцію, і це виробництво АФК також може бути однією з причин реперфузійного пошкодження, викликаного церебральною ішемією [11].

Нами виявлено достовірне зростання активності каспази-3 у гострому періоді ІІ. Спостерігалася залежність активності каспази-3 від підтипу ІІ.

Встановлено, що при ЛІ активність каспази-3 була достовірно вищою, ніж при інших підтипах ІІ ( $p < 0,05$ ), при КЕІ – достовірно нижчою ( $p < 0,05$ ), ніж при ЛІ та АТІ, а при ГДІ – достовірно відрізнялася лише від показників хворих з ЛІ. При КЕІ та ГДІ активність каспази-3 достовірно не відрізнялася між собою. Не зважаючи на високу активність каспази-3 на 1-шу добу ЛІ, нами також було виявлено, що при ЛІ має місце найменша кількість лейкоцитів у апоптозі та некрозі. Тобто, не спостерігалася залежності між вираженістю апоптозу та некрозу з активністю каспази-3 на 1-шу добу ЛІ та інших підтипів ІІ. Також не було виявлено кореляційного зв'язку між активністю каспази-3 та розміром вогнища при ЛІ, визначеним за допомогою МРТ.

Останні дослідження показали, що активація каспази-3 не обов'язково індукує незворотно апоптичну клітинну смерть нейронів, яка пов'язана з фрагментацією ДНК [12]. Це може відбуватися в результаті короточасної глюкозо-кисневої депривації, проте навіть при нетривалій ішемії каспаза-3 спричиняє руйнування з'єднувальних білків ендотелію, викликаючи підвищення проникливості ГЕБ. При тривалій ішемії (4 години і більше) з наступною реоксигенацією проходить вивільнення матриксних металопротеаз (ММР-2 та ММР-9), які в подальшому активують каспазу-3, що призводить до смерті ендотеліальних клітин через порушення клітинно-матриксної взаємодії та гомеостазу інтегринових сигнальних шляхів [13]. Це спричиняє апоптоз і ДНК-фрагментацію. Експериментальними дослідженнями було встановлено, що в ішемічному ядрі каспази інактивовані у зв'язку з швидким виснаженням АТФ, пошкодженням внутрішньоклітинного іонного складу, масивною продукцією оксиду азоту чи АФК через активацію кальпаїну [14]. На наш погляд, саме так можна пояснити найвищу активність каспази-3 при ЛІ та нижчу при АТІ та КЕІ. Інше можливе пояснення – це висока активність каспази-3 до гострої судинної події, яка зумовлена множинним системним ураженням судин (гіпертензивною васкулопатією) при даному підтипі ІІ. При цьому була відмічена залежність між активністю каспази-3 та розширенням периваскулярних просторів, з наявністю лейкоареозу за даними нейровізуалізаційних методів обстеження, а також кількістю ішемічних вогнищ при ЛІ. Так, при наявності одного лакунарного вогнища активність каспази-3 склала ( $13,25 \pm 0,98$ ), при двох – ( $15,32 \pm 0,75$ ), при трьох – ( $16,08 \pm 0,84$ ) пмоль/мг білка.

При детальному аналізі було встановлено, що при АТІ мала місце залежність активності каспази-3 від розмірів інсульту ( $r = 0,378$ ,  $p = 0,047$ ). При виключенні пацієнтів з розмірами інсульту до 10 см<sup>3</sup> активність каспази-3 достовірно не відрізнялася від показників хворих з ЛІ, що склало ( $16,85 \pm 0,56$ ) пмоль/мг білка.

На 7-му добу відмічено достовірне ( $p < 0,05$ ) зниження активності каспази-3 в цілому в обстежуваних пацієнтів у порівнянні з 1-ою добою, що становило ( $5,84 \pm 0,83$ ) пмоль /мг білка. Але, не зважаючи на це, активність каспази-3 залишалася достовірно ( $p < 0,05$ ) вищою, ніж у КГ.

При аналізі динаміки активності каспази-3 при різних підтипах ІІ виявлено, що достовірно її зниження спостерігалася при ЛІ та ГДІ та було відсутнє при АТІ. При АТІ на 7-му добу спостерігалися найвищі значення каспази-3 (достовірно вищі, ніж при ЛІ та КЕІ ( $p < 0,05$ )). Проведені дослідження вказують на те, що каспаза-3 відіграє певну роль у апоптичних процесах, зокрема у розвитку атеросклерозу та нестабільності атеросклеротичної бляшки і узгоджуються з результатами інших досліджень [15].

Не встановлено достовірного кореляційного зв'язку між активністю каспази-3 на 1-шу добу ІІ та кількістю ANV<sup>+</sup>-клітин ( $r = 0,333$ ,  $p = 0,922$ ). Також не спостерігалася достовірної залежності між активніс-



ттю каспази-3 та вмістом  $PI^+$ -клітин як на 1-шу, так і на 7-му добу II: ( $r=-0,307$ ;  $p=0,175$ ) та ( $r=-0,313$ ;  $p=0,206$ ) відповідно.

На 7-му добу II виявлено достовірний зворотній кореляційний зв'язок між активністю каспази-3 та вмістом  $ANV^+$ -клітин ( $r=-0,581$ ;  $p=0,006$ ), а також між активністю каспази-3 і кількістю  $AФК^+$ -клітин ( $r=-0,605$ ,  $p=0,049$ ). Отримані кореляції можуть вказувати на те, що висока активність каспази-3 пришвидшувала апоптоз лейкоцитів та призводила до зменшення клітин з підвищеним внутрішньоклітинним оксидантним стресом.

Враховуючи знайдені кореляції між активністю каспази-3 та вмістом клітин у стадії апоптозу та некрозу, можна думати, що активація каспази-3 на 7-му добу II в більшій мірі пов'язана з процесами апоптозу та некрозу, ніж на 1-шу добу, беручи до уваги особливості її активації в ядрі інфаркту і в ділянці пенумбри [15].

Аналіз активності катепсину D у гострому періоді II виявив достовірно вищі показники у порівнянні з КГ. Спостерігалася недостовірною позитивна динаміка ЗА та ВА катепсину D на 7-му добу II у порівнянні з 1-ою добою.

Встановлено, що патогенетичний тип II впливав на показники ЗА та ВА катепсину D. При КЕІ на 1-шу добу II відмічалися високі показники катепсинової активності з достовірно ( $p<0,05$ ) вищими значеннями у порівнянні з АТІ та ЛІ. На 7-му добу КЕІ у 27 (45,0 %) хворих спостерігалася достовірне ( $p<0,05$ ) зниження ЗА та ВА катепсину D у порівнянні з 1-ою добою. До цієї групи увійшли хворі з невеликими за розмірами інсультами та відносно швидким регресом неврологічної симптоматики.

При АТІ на 1-шу добу виявлено достовірно ( $p<0,05$ ) нижчі по відношенню до КЕІ та ГДІ показники ЗА та ВА. Проте на 7-му добу інсульту у 53 (85,4 %) хворих з АТІ спостерігалася достовірне ( $p<0,05$ ) підвищення активності ЗА і ВА і лише у 9 (14,6 %) пацієнтів ЗА та ВА катепсину D знижувалася у порівнянні з 1-ою добою. При АТІ зростання активності катепсину D протягом першого тижня II може бути пов'язано з лізосомальним шляхом активації апоптозу, що проходив паралельно з апоптозом, пов'язаним з мітохондріальною дисфункцією. Наше припущення може в певній мірі підтверджуватися виявленими кореляційними зв'язками між кількістю лейкоцитів у стадії апоптозу та ЗА катепсину D на 7-му добу АТІ ( $r=0,520$ ,  $p=0,034$ ).

ЗА та ВА катепсину D на 1-шу добу ГДІ була найвищою, достовірно відрізняючись від значень хворих з АТІ та ЛІ. На 7-му добу ГДІ спостерігалася достовірне зниження ВА катепсину D у порівнянні з 1-ою добою ( $p<0,05$ ).

При ЛІ на 1-шу добу інсульту ЗА була достовірно ( $p<0,05$ ) нижчою, ніж при КЕІ та ГДІ і достовірно не відрізнялася у порівнянні з АТІ. ВА катепсину D при цьому інсульті була достовірно ( $p<0,05$ ) нижчою у порівнянні з іншими хворими. На 7-му добу захворювання при ЛІ виявлено достовірне ( $p<0,05$ ) зростання як ЗА, так і ВА катепсину D у порівнянні з 1-ою добою. При цьому у всіх пацієнтів динаміка ЗА та ВА

катепсину D була односпрямованою. ЗА зросла у 2,5 рази, а ВА – у 9,4 рази, чого не спостерігалось при жодному підтипі II. Не зважаючи на дещо нижчі показники ЗА та ВА катепсину D при ЛІ у порівнянні з іншими підтипами II, достовірне зростання цих показників свідчить про підвищення ПЛМ. На наш погляд, гострий ЛІ на фоні системного судинного ураження при гіпертонічній хворобі та цукровому діабеті може бути пусковим фактором вивільнення протеолітичних ензимів з лізосом клітин, активність яких зростає протягом 1-го тижня інсульту.

У літературі є дані про лізосомальний шлях апоптозу, викликаний витоком з лізосом і переміщенням катепсину D. Було показано, що катепсин D може розщеплювати і активувати проапоптотичну молекулу Bid, яка в свою чергу викликає вивільнення цитохрому c з мітохондрій і активацію каспази-3 [16]. Також є дані щодо ФНП-опосередковане переміщення катепсину D з лізосом в ендотеліальних клітинах та розщеплення Bid в клітинах [17]. Виходячи з цього, катепсин D може бути розглянутий в якості про-апоптотичної молекули, хоча з іншого боку він приймає участь і в неапоптичній клітинній смерті [18].

Нами знайдено пряму залежність між активністю катепсину D та активністю каспази-3 на 1-шу добу інсульту у хворих з II ( $r=0,425$ ,  $p=0,032$ ). Це може вказувати на те, що каспазний та лізосомальний шляхи апоптозу активуються одночасно у гострому періоді II.

При ЛІ на 1-шу добу спостерігалися достовірні кореляційні зв'язки між ЗА та вмістом  $ANV^+$ -клітин ( $r=0,590$ ,  $p=0,047$ ), а також між ВА катепсину D та вмістом  $ANV^+$ -клітин ( $r=0,590$ ,  $p=0,047$ ). Як було відмічено раніше, кількість  $ANV^+$ -клітин при ЛІ є найнижчою і не пов'язана з розміром вогнища. Вираженість апоптозу може бути пов'язана з апоптозом ендотеліоцитів, та бути зумовленою активацією переважно лізосомального шляху апоптозу.

Зростання активності катепсину D, як загальної, так і вільної на 7-му добу ЛІ не корелювала з кількістю лейкоцитів у стадії апоптозу. Таке зростання ЗА та ВА без зв'язку з іншим показником апоптозу може бути пов'язане з іншими механізмами пошкоджуючої дії катепсину D, зокрема прямою дією на з'єднувальні білки ГЕБ.

Нами виявлено помірно виражену достовірну залежність між ЗА катепсину D та вмістом  $AФК^+$ -клітин на 1-шу добу II ( $r=-0,366$ ,  $p=0,054$ ). На 7-му добу інсульту зв'язок між ЗА катепсину D та вмістом  $AФК^+$ -клітин зростав, що склало:  $r=-0,804$ ,  $p=0,003$ . Спостерігалася достовірною помірна кореляційна залежність між вмістом  $AФК^+$ -клітин та ВА катепсину D на 1-шу добу ЛІ ( $r=-0,362$ ,  $p=0,038$ ). На 7-му добу зв'язок між ВА катепсину D та вмістом  $AФК^+$ -клітин ставав сильнішим ( $r=-0,605$ ,  $p=0,049$ ), що може бути пов'язано з впливом  $AФК$  на підвищення ПЛМ.

Таким чином, отримані дані свідчили про зростання процесів апоптозу в результаті мітохондріальної дисфункції, активації каспазного та лізосомального шляхів у гострому періоді II. Виявлено

різну динаміку активності каспази-3 та катепсину Д в залежності від підтипу II.

### 7. Висновки

1. У гострому періоді всіх підтипів II на 1-шу добу має місце мітохондріальна дисфункція, апоптоз та некроз лейкоцитів крові, що проявляється зростанням кількості ANV<sup>+</sup>-, PI<sup>+</sup>-, АФК<sup>+</sup>- та Mito<sup>+</sup>-клітин і є найбільш вираженим при АПІ.

2. Найбільша активність каспази-3 спостерігається на 1-шу добу ЛІ, не корелює з кількістю клітин у стадії апоптозу та розміром вогнища і може свідчити про переважний вплив каспази-3 на ендотелій та підвищення проникливості ГЕБ.

3. При АПІ протягом першого тижня відбувається зростання ЗА катепсину Д, яке корелює з кількістю лейкоцитів у стадії апоптозу на 7-му добу і свідчить про активацію лізосомального шляху апоптозу, який проходить паралельно з апоптозом, пов'язаним з мітохондріальною дисфункцією.

### Література

1. Kelly, P. J. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study [Text] / P. J. Kelly, J. D. Morrow, M. Ning, W. Koroshetz, E. H. Lo, E. Terry et al. // *Stroke*. – 2008. – Vol. 39, Issue 1. – P. 100–104. doi: 10.1161/strokeaha.107.488189

2. Broughton, B. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [Text] / B. Broughton, D. Reutens, C. Sobey // *Stroke*. – 2009. – Vol. 40, Issue 5. – P. 331–339. doi: 10.1161/strokeaha.108.531632

3. Sugawara, T. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation [Text] / T. Sugawara, N. Noshita, A. Lewén et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2002. – Vol. 22, Issue 1. – P. 209–17.

4. Rami, A. Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia [Text] / A. Rami, J. Sims, G. Botez, J. Winckler // *Neurochemistry International*. – 2003. – Vol. 43, Issue 1. – P. 79–87. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00194-8

5. Boya, P. Lysosomal membrane permeabilization in cell death [Text] / P. Boya, G. Kroemer // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27, Issue 50. – P. 6434–6451. doi: 10.1038/onc.2008.310

6. Conus, S. Cathepsin D Primes Caspase-8 Activation by Multiple Intra-chain Proteolysis [Text] / S. Conus, C. Pop, S. J. Snipas et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, Issue 25. – P. 21142–21151. doi: 10.1074/jbc.m111.306399

7. Carew, J. S. Lucanthon is a novel inhibitor of autophagy that induces cathepsin D-mediated apoptosis [Text] / J. S. Carew, C. M. Espitia, J. A. Esquivel, D. Mahalingam, K. R. Kelly, G. Reddy et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, Issue 8. – P. 6602–6613. doi: 10.1074/jbc.m110.151324

8. Kaschina, E. Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of

RAS components [Text] / E. Kaschina, H. Scholz, U. M. Steckelings et al. // *Atherosclerosis*. – 2009. – Vol. 205, Issue 2. – P. 396–403. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.003

9. Dingle, J. T. Cathepsin D. Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown [Text] / J. T. Dingle, A. J. Barrett, P. D. Weston // *Biochem. J.* – 1971. – Vol. 123. – P. 1–13.

10. Karafrou, M. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review [Text] / M. Karafrou, I. Lambrinouadaki, G. Christodoulakos // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 8, Issue 9. – P. 912–918. doi: 10.2174/138955708785132765

11. Liang, J.-M. Role of mitochondrial function in the protective effects of ischaemic postconditioning on ischaemia/reperfusion cerebral damage [Text] / J.-M. Liang, H.-Y. Xu, X.-J. Zhang // *Journal of International Medical Research*. – 2013. – Vol. 41, Issue 3. – P. 618–627. doi: 10.1177/0300060513476587

12. Zehendner, C. M. Moderate Hypoxia Followed by Reoxygenation Results in Blood-Brain Barrier Breakdown via Oxidative Stress-Dependent Tight-Junction Protein Disruption [Text] / C. M. Zehendner, L. Librizzi, J. Hedrich, N. M. Bauer, E. A. Angamo, M. de Curtis, H. J. Luhmann // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, Issue 12. – P. e82823. doi: 10.1371/journal.pone.0082823

13. Lee, S. R. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia-reoxygenation [Text] / S. R. Lee, E. H. Lo // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2004. – Vol. 24, Issue 7. – P. 720–727. doi: 10.1097/01.wcb.0000122747.72175.47

14. Lankiewicz, S. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death [Text] / S. Lankiewicz, C. Marc Luetjens, Nguyen Truc Bui, Aaron J. Krohn, Monika Poppe et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, Issue 22. – P. 17064–17071. doi: 10.1074/jbc.275.22.17064

15. Matulevicius, S. The association between plasma caspase-3, atherosclerosis, and vascular function in the Dallas Heart Study [Text] / S. Matulevicius, A. Rohatgi, A. Khera, S. R. Das, A. Owens, C. R. Ayers et al. // *Apoptosis*. – 2008. – Vol. 13, Issue 10. – P. 1281–1289. doi: 10.1007/s10495-008-0254-1

16. Heinrich, M. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation [Text] / M. Heinrich, J. Neumeyer, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach et al. // *Cell Death and Differentiation*. – 2004. – Vol. 11, Issue 5. – P. 550–563. doi: 10.1038/sj.cdd.4401382

17. Madge, L. A. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis [Text] / L. A. Madge, J. H. Li, J. Choi, J. S. Pober // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, Issue 23. – P. 21295–21306. doi: 10.1074/jbc.m212837200

18. Bröker, L. E. Cell death independent of caspases: a review [Text] / L. E. Bröker, F. A. Kruyt, G. Giaccone // *Clinical Cancer Research*. – 2005. – Vol. 11, Issue 9. – P. 3155–3162. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-2223

### References

1. Kelly, P. J., Morrow, J. D., Ning, M., Koroshetz, W., Lo, E. H., Terry, E. et al. (2007). Oxidative Stress and Matrix

Metalloproteinase-9 in Acute Ischemic Stroke: The Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) Study. *Stroke*, 39 (1), 100–104. doi: 10.1161/strokeaha.107.488189

2. Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., Sobey, C. G. (2009). Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke*, 40 (5), e331–e339. doi: 10.1161/strokeaha.108.531632

3. Sugawara, T., Noshita, N., Lewén, A. et. al. (2002). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci*, 22 (1), 209–217.

4. Rami, A., Sims, J., Botez, G., Winckler, J. (2003). Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia. *Neurochemistry International*, 43 (1), 79–87. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00194-8

5. Boya, P., Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27 (50), 6434–6451. doi: 10.1038/onc.2008.310

6. Conus, S., Pop, C., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., Simon, H.-U. (2012). Cathepsin D Primes Caspase-8 Activation by Multiple Intra-chain Proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (25), 21142–21151. doi: 10.1074/jbc.m111.306399

7. Carew, J. S., Espitia, C. M., Esquivel, J. A., Mahalingam, D., Kelly, K. R., Reddy, G. et. al. (2010). Lucanthone Is a Novel Inhibitor of Autophagy That Induces Cathepsin D-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (8), 6602–6613. doi: 10.1074/jbc.m110.151324

8. Kaschina, E., Scholz, H., Steckelings, U. M., Sommerfeld, M., Kemnitz, U. R., Artuc, M. et. al. (2009). Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components. *Atherosclerosis*, 205 (2), 396–403. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.003

9. Dingle, J. T., Barrett, A. J., Weston, P. D. (1971). Cathepsin D Characteristics of immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown *Biochem. J.*, 123, 1–13.

10. Karaflo, M., Lambrinou, I., Christodoulakos, G. (2008). Apoptosis in Atherosclerosis: A Mini-Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8 (9), 912–918. doi: 10.2174/138955708785132765

11. Liang, J.-M., Xu, H.-Y., Zhang, X.-J., Li, X., Zhang, H.-B., Ge, P.-F. (2013). Role of mitochondrial function in the protective effects of ischaemic postconditioning on ischaemia/reperfusion cerebral damage. *Journal of International Medical Research*, 41 (3), 618–627. doi: 10.1177/0300060513476587

12. Zehendner, C. M., Librizzi, L., Hedrich, J., Bauer, N. M., Angamo, E. A., de Curtis, M., Luhmann, H. J. (2013). Moderate Hypoxia Followed by Reoxygenation Results in Blood-Brain Barrier Breakdown via Oxidative Stress-Dependent Tight-Junction Protein Disruption. *PLoS ONE*, 8 (12), e82823. doi: 10.1371/journal.pone.0082823

13. Lee, S.-R., Lo, E. H. (2004). Induction of Caspase-Mediated Cell Death by Matrix Metalloproteinases in Cerebral Endothelial Cells After Hypoxia–Reoxygenation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24 (7), 720–727. doi: 10.1097/01.wcb.0000122747.72175.47

14. Lankiewicz, S., Marc Luetjens, C., Nguyen Truc Bui, Krohn, Aaron J., Poppe, Monika et. al. (2000). Activation of calpain I converts ex citotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (22), 17064–17071. doi: 10.1074/jbc.275.22.17064

15. Matulevicius, S., Rohatgi, A., Khera, A., Das, S. R., Owens, A., Ayers, C. R. et. al. (2008). The association between plasma caspase-3, atherosclerosis, and vascular function in the Dallas Heart Study. *Apoptosis*, 13 (10), 1281–1289. doi: 10.1007/s10495-008-0254-1

16. Heinrich, M., Neumeier, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchkov, V., Winoto-Morbach, S. et. al. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ*, 11 (5), 550–563. doi: 10.1038/sj.cdd.4401382

17. Madge, L. A., Li, J.-H., Choi, J., Pober, J. S. (2003). Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Sensitizes Vascular Endothelial Cells to Cytokine-initiated Cathepsin-dependent Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (23), 21295–21306. doi: 10.1074/jbc.m212837200

18. Broker, L. E. (2005). Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*, 11 (9), 3155–3162. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-2223

*Дата надходження рукопису 15.05.2015*

**Сохор Наталія Романівна**, кандидат медичних наук, доцент, кафедра неврології, психіатрії, наркології і медичної психології, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського» МОЗ України, майдан Волі, 1, м. Тернопіль, Україна, 46001  
E-mail: sokhor@mail.ru

**Шкробот Світлана Іванівна**, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра неврології, психіатрії, наркології і медичної психології, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського» МОЗ України, майдан Волі, 1, м. Тернопіль, Україна, 46001  
E-mail: svitlana-2006@mail.ru

**Бударна Олена Юрївна**, кандидат медичних наук, доцент, кафедра неврології, психіатрії, наркології і медичної психології, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського» МОЗ України, майдан Волі, 1, м. Тернопіль, Україна, 46001  
E-mail: budarna-23@mail.ru

**Ясний Оксана Романівна**, кандидат медичних наук, доцент, кафедра педіатрії ФПО, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського» МОЗ України, Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, Україна, 46001  
E-mail: sokhor@mail.ru