

© Коллектив авторов, 2013  
УДК 616-092.18

С.П. Сергеева<sup>1</sup>, П.Ф. Литвицкий<sup>1</sup>, М.М. Гульяев<sup>2</sup>, А.А. Савин<sup>2</sup>, И.Д. Бреславич<sup>3</sup>

## ***К механизму Fas-индуцированного апоптоза нейронов в патогенезе ишемического инсульта***

<sup>1</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>2</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1

*Изучена динамика содержания в плазме крови Fas (CD95), растворимого Fas рецептора (sFas) и растворимого Fas лиганда (sFasL) при ишемическом инсульте (ИИ), корреляция уровней последних с тяжестью неврологических проявлений, установлена роль указанных молекул в механизме Fas-индуцированного апоптоза нейронов при ИИ. Концентрацию sFas, sFasL определяли иммуноферментным методом, экспрессию CD95 на CD3 лимфоцитах — проточной цитометрией. Показано, что Fas-индуцированный апоптоз играет значимую роль в патогенезе ИИ. Уровень sFasL отражает тяжесть состояния пациентов при ИИ. В связи с этим представляется перспективным поиск новых путей коррекции процессов апоптоза в лечении больных ИИ.*

**Ключевые слова:** патогенез ишемического инсульта, апоптоз, sFas, sFasL, Fas, CD95

S.P. Sergeeva, P.F. Litvickiy, M.M. Gulyaev, A.A. Savin, I.D. Breslavich

## ***To the Fas-induced neurons apoptosis mechanisms in stroke pathogenesis***

<sup>1</sup> The First Sechenov Moscow State Medical University, 8-2, Trubetskaya str., Moscow, 119992, Russia

<sup>2</sup> Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1, Delegatskaya str., 127473, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, 1-4, Leninskiye Gory, 119991, Russia

*The goal of the present study was to investigate the plasma levels of proteins regulating Fas-induced apoptosis in acute stroke and to relate ones to brain damage and clinical features. By means of ELISA soluble Fas receptor (sFas) and soluble Fas ligand (sFasL) plasma levels were detected. Fas protein (CD95) expression on CD3 lymphocytes surfaces was detected using flow cytometry. It is summarized, that Fas-induced apoptosis play significant role in stroke pathogenesis. As the result, prognostic significance of sFasL plasma level is showed. Fas induced apoptosis mechanisms seems to be perspective target for search new therapy stroke patients.*

**Key words:** stroke pathogenesis, apoptosis, sFas, sFasL, Fas, CD95

Инсульт является одной из главных причин смертности и инвалидизации человека во всех странах мира [2]. В связи с этим необходим поиск надежных методов диагностики, прогноза, лечения, профилактики последствий и реабилитации пациентов после перенесенного инсульта. Успех этой работы в большой мере определяется знанием фундаментальных клеточных и молекулярных звеньев патогенеза инсульта.

Показано, что апоптоз является основным механизмом гибели клеток в перинфарктной зоне [3, 6, 7]. Активации каспаз, в том числе посредством системы FAS с последующим образованием FADD

(FAS ассоциированный с доменом смерти) принадлежит значимая роль в патогенезе инсульта. Ингибирование указанной системы приводит к уменьшению степени поражения нервной ткани у животных после церебральной ишемии в эксперименте [4, 8]. В результате альтернативного сплайсинга, а также отщепления надмембранной части Fas-рецептора (Fas, CD95) или лиганда (FasL, CD178) металлопротеиназами (ММР) образуются растворимые молекулы Fas (соответственно sFas и sFasL), способные регулировать (индуцировать или ингибировать) развитие апоптоза [1, 5].

*Цель исследования* — изучение динамики содержания в крови CD3CD95 лимфоцитов, растворимого Fas рецептора (sFas) и растворимого Fas лиганда (sFasL)

**Для корреспонденции:** Сергеева Светлана Павловна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ. E-mail: svetlanapalna@mail.ru

при ишемическом инсульте (ИИ), корреляции их уровней с тяжестью неврологических проявлений, установление роли указанных молекул в механизме Fas-индуцированного апоптоза нейронов при ИИ.

### Методика

Проведено проспективное одноцентровое контрольно-групповое исследование. Оно не предполагало вмешательства в план диагностических и лечебных мероприятий: все пациенты получали объем медицинской помощи в соответствии со стандартом медицинской помощи больным с инсультом (при оказании специализированной помощи). Исследование соответствовало требованиям Хельсинской Декларации.

Критериями включения в исследование были: впервые развившийся ИИ, установленный клинически и при помощи методов нейровизуализации (КТ, МРТ); критериями исключения: наличие черепно-мозговых травм, транзиторных ишемических атак, рассеянного склероза, онкологических и аутоиммунных заболеваний в анамнезе, аллергических реакций на момент исследования.

Критерии включения в группу контроля: возраст, сопоставимый с группой исследования, отсутствие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения, черепно-мозговых травм, транзиторных ишемических атак, рассеянного склероза, онкологических и аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций на момент исследования.

Для объективизации оценки тяжести состояния, выраженности очагового неврологического дефицита и динамики клинических показателей использовалась балльная шкала инсульта Национального института здоровья (NIHSS). Концентрацию sFas, sFasL определяли на 1-е, 7-е и 21-е сут. после ИИ методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартных тест-систем (Bender Medsystems, Vienna, Austria). Содержание CD95 лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, France).

Обследовали больных, женщин (средний возраст 75 лет) и мужчин (средний возраст 68 лет), с впервые развившимся ИИ на 1-е, 7-е и 21-е сут. заболевания ( $n=60$ ). Группу контроля составили 25 чел. (средний возраст 72 года) (таблица).

Для анализа фактических данных использовали следующие статистические методы: дисперсионный, корреляционный, регрессионный, кластерный анализ данных. Данные были проверены на нормальность распределения по тесту Шапиро—Уилка. Использовались параметрические ( $t$ -тест Стьюдента) и непараметрические ( $U$ -тест Манна—Уитни) критерии оценки статистической значимости различий. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Достоверной динамики концентрации sFas на 1-е и 7-е сут. не выявлено. Однако на 21-е сут. она была достоверно ниже значения указанного параметра на 7-е сут. исследования (рис. 1). Достоверных отличий от показателей группы контроля ( $83,61 \pm 24,61$  пг/мл) не выявлено на всех сроках исследования. Вместе с тем, в группе пациентов с благоприятным исходом (балл по NIHSS на 21-е сут. ниже 5) отмечена тенденция к увеличению концентрации sFas: на 7-е сут. исследования она была достоверно выше ( $p < 0,05$ ), чем в группе контроля. Учитывая низкий коэффициент корреляции ( $r < 0,01$ ,  $p > 0,05$ ) между sFas и баллом по шкале NIHSS данный параметр предположительно не оказывает значимого влияния на тяжесть и исход ишемического инсульта. Отсутствие достоверной зависимости между значением концентрации sFas на первые сутки и баллом по шкале NIHSS на 21-е сут. говорит об отсутствии прогностической значимости данного параметра.

На всех сроках исследования отмечалась тенденция к росту концентрации sFasL — достоверно она отличалась от группы контроля ( $149,72 \pm 12,06$  нг/мл) на всех сроках исследования и составляла  $197,65 \pm 10,15$ ,  $181,28 \pm 9,2$  и  $210,52 \pm 15,63$  нг/мл на 1-е, 7-е и 21-е сут. соответственно (рис. 2). Высокий положительный коэффициент корреляции ( $r = 0,23$ ,  $p < 0,05$ )

Таблица

Характеристика обследованных пациентов и группы контроля

		Группа контроля	Группа ИИ	Группа ИИ с благоприятным исходом	Группа ИИ с неблагоприятным исходом
<b>Мужчины</b>	Кол-во	12	23	12	11
	Возраст	$69 \pm 7$	$68 \pm 9$	$66 \pm 9$	$70 \pm 7$
<b>Женщины</b>	Кол-во	13	37	23	14
	Возраст	$75 \pm 6$	$75 \pm 8$	$73 \pm 7$	$78 \pm 5$
<b>Всего</b>	Кол-во	25	60	35	25
	Возраст	$72 \pm 10$	$72 \pm 11$	$71 \pm 11$	$74 \pm 12$

между sFasL и баллом по шкале NIHSS указывает на то, что данный параметр отражает тяжесть состояния пациентов с ИИ. Прогностическая значимость указанного параметра, учитывая высокое значение коэффициента корреляции ( $r=0,23$ ) и достоверности этого результата ( $p<0,05$ ), высокая. Возможно, увеличение концентрации sFasL свидетельствует об активации механизмов компенсации в ответ на увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для лейкоцитов. При проникновении через ГЭБ лейкоциты экспрессируют металлопротеиназы (ММП), которые также приводят к демиелинизации и апоптозу олигодендроцитов, регулируют активность нейротрофических факторов, подавляют аксональный рост, отсекают надмембранную часть Fas и FasL, образуя их растворимые формы [5]. Увеличение уровня sFasL приводит к нарастанию масштаба апоптоза лимфоцитов и моноцитов не только в поврежденной ткани головного мозга, но и в крови, а также нейронов и глиальных клеток, на поверхности которых экспрессируется CD95 [8]. В результате этого апоптоз активируется в нервных, а также в глиальных клетках, составляющих ГЭБ. В результате этого проницаемость ГЭБ остается повышенной. Порочный круг замыкается. sFasL образуется также и в результате альтернативного сплайсинга.

При оценке изменения количества субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD3CD95 выявлено достоверное их увеличение на 1-е сут. исследования, наиболее выраженное в группе пациентов с неблагоприятным исходом (балл по NIHSS на 21-е сут. выше 5) (рис. 3). Такой результат, наряду с увеличением концентрации sFasL в периферической крови, может быть одной из причин активации апоптоза лимфоцитов и развития лимфопении в течение 1-х сут. ИИ. В группе пациентов с благоприятным исходом заболевания к 7-м и 21-м сут. исследования процентное содержание CD3CD95 лимфоцитов достоверно не отличалось от контрольных значений. Корреляционный анализ показал положительные связи между баллом по шкале NIHSS и указанным параметром. При оценке прогностической значимости достоверного результата не получено, однако этот параметр является прогностически значимым на 7-е сут. исследования (высокая достоверная зависимость между содержанием CD3CD95 лимфоцитов на 7-е сут. и баллом по NIHSS на 21-е).

Таким образом, полученные фактические данные дают основания считать, что Fas-индуцированный апоптоз играет значимую роль в патогенезе ИИ.

Концентрацию sFasL в плазме крови на 1-е сут. после ИИ и содержание CD3CD95-положительных лимфоцитов на 7-е сут. можно считать значимыми параметрами для оценки прогноза состояния пациентов при ИИ.

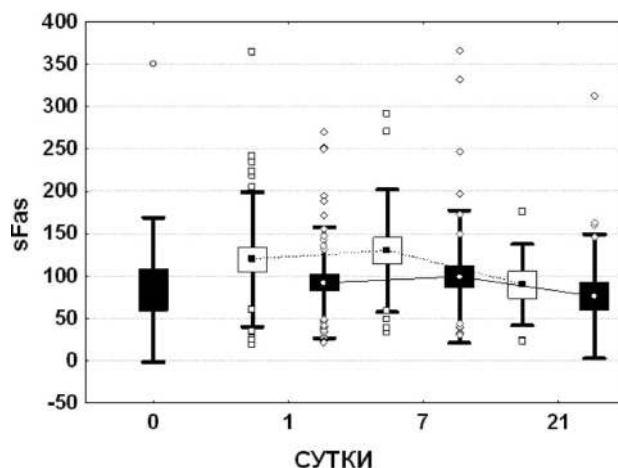


Рис. 1. Концентрация sFasL в крови на 1-е, 7-е, 21-е сут. после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл)

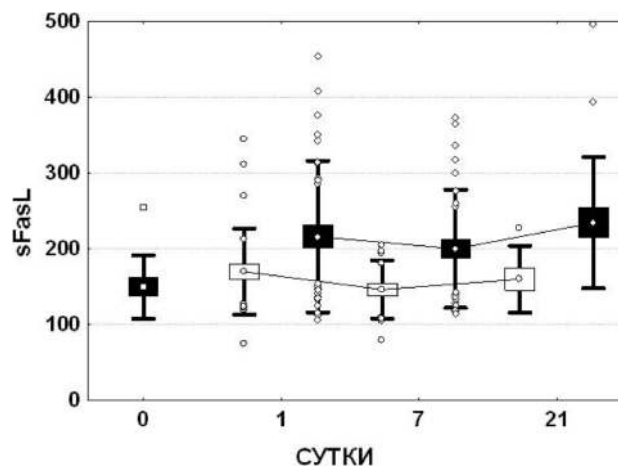


Рис. 2. Концентрация sFasL в крови на 1-е, 7-е, 21-е сут. после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (пг/мл)

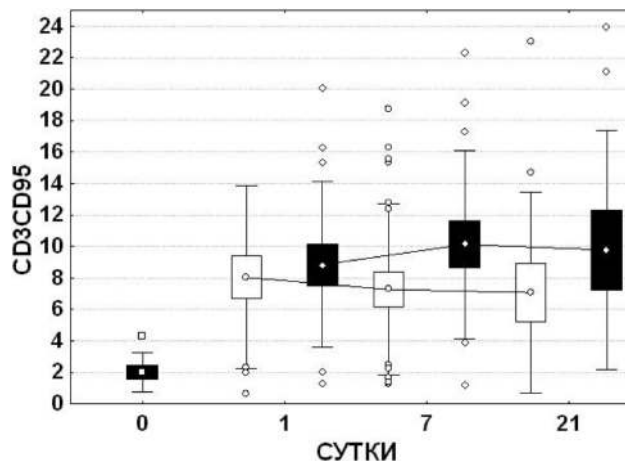


Рис. 3. Содержание CD3CD95 лимфоцитов в крови на 1-е, 7-е, 21-е сут. после ИИ у пациентов в группе с благоприятным исходом (белый), в группе с неблагоприятным исходом (черный) и в группе контроля (К) (%)

Концентрация sFasL отражает тяжесть состояния пациентов. С учетом указанных фактов представляется перспективным поиск путей воздействия на механизмы Fas-индуцированного апоптоза в диагностике, оценке прогноза и эффективности лечения пациентов с ИИ.

### Список литературы

1. *Hoke M., Schillinger M., Zorn G.* et al. The prognostic impact of soluble apoptosis-stimulating fragment on mortality in patients with carotid atherosclerosis // *Stroke*. — 2011. — №42. — P. 2465-2470.
2. *Mathers C.D., Boerma T., Ma Fat D.* Global and regional causes of death // *British medical bulletin*. — 2009. — №92. — P. 7-32.
3. *Morillas P., Andrade H., Castillo J.* et al. Inflammation and apoptosis in hypertension. Relevance of the extent of target organ damage // *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. — 2012. — Vol. 65, №9. — P. 819-825.
4. *Niua F., Zhang X., Hue X.* et al. Targeted mutation of Fas ligand gene attenuates brain inflammation in experimen-

tal stroke // *Brain, Behavior, and Immunity*. — 2012. — Vol. 26, №1. — P. 61-71.

5. *Ramos-Fernandez M., Bellolio M.F., Stead L.G.* Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: asystematic review // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. — 2011. — Vol. 20, №1. — P. 47-54.

6. *Saino O., Taguchi A., Nakagomi T.* et al. Immunodeficiency reduces neural stem/progenitor cell apoptosis and enhances neurogenesis in the cerebral cortex after stroke // *Journal of Neuroscience Research*. — 2010. — Vol. 88, №11. — P. 2385-2397.

7. *Sairanen T., Karjalainen-Lindsberg M.L., Paetau A.* et al. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke — a possible target of antiapoptotic treatment // *Brain*. — 2006. — №129. — P. 189-199.

8. *Strasser A., Jost P.J., Nagata S.* The many roles of FAS receptor signaling in the immune system // *Immunity*. — 2009. — №30. — P. 180-192.

Поступила 26.02.13

### Сведения об авторах:

*Литвицкий Петр Францевич*, д-р мед. наук, зав. каф. патофизиологии ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

*Гультяев Максим Михайлович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний ГБОУ ВПО МГМСУ им. Евдокимова Минздрава РФ

*Савин Алексей Алексеевич*, д-р мед. наук, проф. каф. нервных болезней ГБОУ ВПО МГМСУ им. Евдокимова Минздрава РФ

*Бреславич Илья Дмитриевич*, соискатель, механико-математический факультет ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова