

УДК 616.5-004.1:616.081.1-092+576.311.347

**ПОКАЗНИКИ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ МАРКЕРІВ АПОПТОЗУ,
ЯК КРИТЕРІЇ АДЕКВАТНОСТІ ВІДБРАНОЇ ТЕРАПІЇ
ПРИ ЛІКУВАННІ ВОГНИЩЕВОЇ СКЛЕРОДЕРМІЇ**

Г.В.Ніколашин, В.А.Бабанін, І.М.Кравченко, П.М.Колбасін, Л.П.Колбасіна, А.А.Пісарєв
Кримський державний медичний університет ім. С.І.Георгієвського

Ключові слова: вогнищева склеродермія, апоптоз, лікування.

Актуальність теми. В останнє десятиліття у зв'язку з активним розвитком медицини істотно розширилися уявлення про системні захворювання сполучної тканини, серед яких далеко не останнє місце займає склеродермія. Склеродермія - хронічне запальне захворювання сполучної тканини, що характеризується її ущільненням (склерозуванням), зазвичай вражає шкіру (вогнищева форма), однак при неадекватному лікуванні і при впливі різних факторів також може вражати внутрішні органи (системна форма) - шлунково-кишковий тракт, серце, легені, нирки та синовіальні тканини. Етіологія захворювання досить складна і не до кінця ще вивчена: склеродермії часто відносять до аутоімунних захворювань; вчені і лікарі вважають що мультифакторіальних генез, обумовлений взаємодією несприятливих екзо-і ендогенних факторів, з генетичною схильністю до захворювання є причиною даної патології. Особливу увагу приділяють критичної дії хімічних агентів (промислових, побутових, аліментарних) і деяких лікарських засобів [3, 4, 5]. Завдяки сучасним дослідженням розшифровані деякі генетичні механізми схильності до системного склерозу, що раніше аргументувалося спадковою схильністю до даної патології. Виявлено сполучення певних антигенів і алелів системи гістосумісності HLA з системним склерозом: A9, B8, B27, B35, DR1, DR3 (хронічний перебіг), DR5 (підгострий перебіг), DR11, DR52 і C4A. Також склеродермія може виникнути у дітей будь-якого віку; частіше хворіють хлопчики. При гістологічному дослідженні

уражених ділянок шкіри відзначаються потовщення і ущільнення колагенових волокон дерми, а також периваскулярні інфільтрати, що складаються з мононуклеарних клітин. Як і будь-яке хронічне захворювання, склеродермія може мати серйозні наслідки. Симптоми захворювання сильно варіюють; наслідки склеродермія можуть варіювати від практично непомітних до загрозливих життю проявів. Визначення тяжкості патології може залежати також від локалізації патологічного процесу. При неадекватному лікуванні захворювання може переходити в системну форму. Рання діагностика і вибір вірної тактики лікування може значно знизити клінічні прояви склеродермії і зменшити ймовірність необоротних морфологічних змін в органах і тканинах [1, 3, 4]. Тенденція до збільшення захворюваності, соціальна значимість проблеми в зв'язку з частим ураженням осіб середнього працездатного віку та можливою інвалідністю, торпідний рецидивуючий перебіг визначають актуальність подальшого вивчення теоретичних і практичних аспектів цієї патології. Взаємодія різноманітних факторів у розвитку захворювання ускладнює вибір методів лікування та знижує часом їх ефективність.

Апоптоз - програмована клітинна загибель, яка супроводжується характерними змінами: зменшення її розміру, конденсації і фрагментації хроматину, ущільненні зовнішньої і цитоплазматичної мембран без виходу вмісту клітини в навколишнє середовище. Специфічним сигналом запуску апоптозу є наявність маркера CD95, на поверхні клітин. Норма CD95 - від 0% до 5%.

Запрограмована загибель є результатом реалізації генетичної програми. Головна відмінність некрозу від апоптозу в тому, що некроз - це смерть клітини внаслідок її пошкодження (хімічного, термічного, рентгенівського випромінювання і т. д.). Під час некрозу клітина вакуолізується (змінюється будова зовнішньої плазматичної мембрани, за градієнтом концентрації вода надходить усередину клітини, всі органели починають набухати), лізосоми перетравлюють весь вміст клітини, клітина лопається. Її вміст викидається в позаклітинний простір, що викликає запалення, і надалі поглинається фагоцитами. Характерними ознаками апоптозу, що дозволяють відрізнити його від некрозу, є: перехід фосфатидилсерину з внутрішнього осадження моношар з цитоплазматичної мембрани в зовнішній монослой, вихід цитохрому С з межмембранного простору мітохондрій у цитоплазму, активація цистеїнових протеїназ (каспаз), освіта активних форм кисню, зморщування цитоплазматичної мембрани, зменшення об'єму клітини, розриви ниток ядерної ДНК в межнуклеосомальних ділянках, конденсація хроматину по периферії ядра, подальший розпад ядра на частини, фрагментація клітин на везикули з внутрішньоклітинним вмістом - апоптотичні тільца. Апоптотичні тіла захоплюються сусідніми клітинами, можуть бути захоплені й фагоцитами, як у випадку некрозу. Викиду клітинного вмісту не відбувається, запалення не виникає. Некроз характерний для групи клітин, апоптоз для однієї. Проявом недостатності апоптозу служить неконтрольоване ділення атипичних клітин, тобто утворення і зростання пухлини. У той же час, посилений апоптоз може призводити до раннього старіння, розвитку клітинної аплазії та дегенерації. При розробці сучасних методів терапії (напр. протипухлинної) чимало уваги приділяється процесам клітинної регуляції та індукції апоптозу [2].

Мета дослідження – визначення кількості мітохондріальних маркерів апоптозу в залежності від строків захворювання склеродермію, розробка максимально ефективної терапії шляхом створення оптимальної схеми етіотропної і патогенетичної терапії, що включає застосування новітніх лікарських засобів та їх комбінування з фізіотерапією для отримання і закріплення максимального лікувального ефекту.

Матеріал та методи дослідження. Для проведення дослідження було вибрано 60 пацієнтів з вогнищевою склеродермію. Контрольну групу склали 20 здорових людей. Для проведення спостереження було виділено 3 групи хворих, з різною тривалістю захворювання. Першу групу склали 22 пацієнта, з тривалістю хвороби 2 місяці. Другу групу - 17 пацієнтів, з тривалістю хвороби 4 місяці. Третю - 21 пацієнт, з терміном захворювання 6 місяців. Крім того, обстежено 20 практично здорових осіб, що не страждають цією патологією, які склали контрольну групу. Ми скористалися сучасною технологією швидкого оптичного вимірювання параметрів клітини, процесів, які тривають в ній - проточної цитометрії. В даний час проточна цитометрія застосовується для виявлення певних клітин в досліджуваних зразках (як бактеріальних і грибових, так і власних клітин організму людини), визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, а також моніторингу стану вірусного процесу у ВІЛ-інфікованих пацієнтів. Для обліку отриманих результатів ефективності терапії використовували наступні маркери: CD95 - рецептор поверхні клітини, здатний запускати в ній апоптоз після взаємодії його з Fas-лігандом або монокланальними антитілами до Fas, APO2.7 - для визначення відсоткової частки клітин, які зазнали апоптозу. Методика заснована на властивості антигену APO2.7 (також званого 7A6) з'являється на мембрані мітохондрії апоптозну клітин. Експресія APO2.7 визначається на ранніх стадіях

апоптозу. Так само АРО2.7 може виявлятися в клітинах після впливу радіації, обробки лікарськими засобами або зв'язування CD-95 з Fas-лігандом. Живі клітини негативні або слабо позитивні до цього антигену. Для отримання максимально швидкого та ефективного лікувального ефекту ми замінили і доповнили деякі препарати стандартної схеми лікування наступними: "Вобензим", "Купреніл", "Медобіотін". На додаток цій схемі лікування ми додали комплекс фізіопродсedur: аплікації сакськими грязями і фонофорез (з використанням поліферментні мазі "Вобемугос"), лікувальний масаж (Схема).

Схема етіотропної і патогенетичної терапії при лікуванні склеродермії. ВОБЕНЗИМ® - системний поліензім, препарат є комбінацією високоактивних ферментів рослинного і тваринного походження з імуномодулюючою, протизапальною, протинабряковою, фібринолітичну і вторічноанальгезуючу дію; приймати по 3 драже за 0,5 год до прийому їжі, 3 рази на день, тривалість прийому - 1-2 міс (чергувати через місяць прийому з тренталом); ТРЕНТАЛ® - препарат, що покращує мікроциркуляцію, ступінчастий шлях введення: перші 5-10 днів - парентерально, наступні 10 днів - per os по 5 мг. на 100-200 мл не частіше 2-3х раз на тиждень; в інтервалах між прийомами препарату - приймати в звичайних терапевтичних дозах; (чергувати через місяць прийому з вобензимом); ВОБЕ-МУГОС Е® - поліферментні мазь, що представляє собою комбінацію високоактивних ензимів рослинного та тваринного походження для фонофорезу (10 сеансів); КУПРЕНІЛ® - D-пеніцилламін, приймати в середніх терапевтичних дозах, 2 рази на добу через годину після прийому їжі (0.25 мг); приймати щодня безперервно протягом двох місяців (інтервал між повторним прийомом 1,5 міс); МЕДОБІОТІН® - Біотин являє собою водорозчинний вітамін групи В. Біотин є життєво важливим для розвитку та росту клітин. В якості

коферменту він служить переносником CO₂ та різних ферментів, а також відіграє важливу роль у гліюконеогенезі, ліпогенезі, біотрансформації пропіонат та розщепленні лейцину. Приймати по 1 таб. 1 раз на добу.

Результати дослідження. З аналізу отриманих даних випливає, що у хворих на вогнищеву склеродермію має місце посилення апоптозу (підвищення рівня CD95 та експресії АРО2.7) (табл. 1, табл. 2). Ступінь деградації клітинного імунітету відбивається у зворотньому кореляційного зв'язку між показниками клітинного імунітету (зменшення кількості CD3+ і CD4+) і показниками апоптозу (зростання CD95 і АРО2.7). Іntenсифікація патологічного процесу має місце за рахунок загибелі клітин CD3+ і CD4+. Сприятлива динаміка з боку патологічного процесу починала виявлятися к кінцю другого тижня від початку лікування (таб.4). Покращився загальний стан хворих, зменшилася оніміння в осередках ураження, свербіж, парестезії, поступово ліквідувалися запальні явища в набряково-еріматозної фазі. У стадії індурації шкіра ставала м'якше, еластичнішою, стали утворюватися ділянки атрофії. До кінця курсу у всіх хворих основної групи констатовано досить високий ступінь клінічного поліпшення. Найкращі результати отримані у хворих з бляшковою формою склеродермії, особливо при локалізованому процесі - клінічна ремісія 30% у порівнянні з 17% пацієнтів з поширеним процесом (відмінності достовірні $p < 0,01$), значне поліпшення зареєстровано в 50% і в 29% випадків відповідно ($p < 0,05$). У групі хворих зі склероатрофічним ліхеном клінічна ремісія досягнуті в 15% випадків, значне поліпшення - в 56,4%. Лнійна форма склеродермії виявилася більш резистентною до проведеної терапії, значне поліпшення відзначено в 42% випадків у порівнянні з 50% ($p < 0,05$). Аналізуючи ефективність комплексного лікування залежно від активності

склеродермічної процесу, ми встановили, що клінічної ремісії в стадії появи еритеми вдалося досягти тільки у трьох хворих з одиничними вогнищами. В інших пацієнтів цієї групи довше зберігалася запальна реакція у вигляді почервоніння і набрякlostі в центрі вогнищ та фіолетового обідка по периферії. Значне поліпшення зареєстровано у 45% хворих, поліпшення - у 48%, незначне поліпшення 7%. Ще більш високі результати були отримані у хворих, що знаходилися в стадії індурації після затухання активності процесу. Ущільнення у вогнищах поразки повністю зникли (клінічна ремісія) у 45% хворих, зберігалися залишкові явища (значне поліпшення) 30%, часткова індурація - 15%. Як впливає з аналізу отриманих даних, у хворих на вогнищеву склеродермію мало місце посилення апоптозу (підвищення рівня CD95 позитивних лімфоцитів і APO2.7). Досліджуючи кореляційні зв'язки між рівнем показників клітинного імунітету та показниками апоптозу, ми звернули увагу

на наявність тісного зворотного кореляційного зв'язку ($r > -0,5$) між показниками клітинного імунітету (зменшення кількості CD3+, CD4+) і показниками апоптозу (підвищення рівня CD95 і APO2.7). Данні зворотнього кореляційного зв'язку відображають ступінь деградації клітинного імунітету. Має місце інтенсифікація процесів апоптозу за рахунок загибелі клітин CD3+ і CD4+.

Висновки.

Активність склеродермічної процесу перебувала в чіткій залежності від проведеної терапії. Лікування, проведене в період індурації, виявилось більш ефективним, ніж у гострій і підгострій стадії при наявності запальної активності та переважання шкірної еритеми, однак стан атрофії змінювалася мало. Запропонований комплекс лікувальних заходів приводить до швидкого вираженому поліпшенню і стійкої ремісії.

Таблиця 1

Показники мітохондриальних маркерів апоптозу у хворих на вогнищеву склеродермію

Показники	Од. вим.	Хворі (n=60) (M±m)	Здорові (n=15) (M±m)
CD95	10 ⁹ /л	0.79±0.04	0.35±0.07
		P<0.05	
	%	23.5±1.11	16.6±0.5
		P<0.05	
APO2.7	нг/мл	21.5±0.78	4.51±0.55
		P<0.001	

Таблиця 2

Показники мітохондриальних маркерів апоптозу у хворих на вогнищеву склеродермію в залежності від тривалості захворювання (M±m)

Показники	Од. вим.	2 міс (n=22)	4 міс (n=17)	6 міс (n=21)	Здорові (n=15)
CD95	10 ⁹ /л	0.55±0.22	0.78±0.01	0.91±0.01	0.35±0.07
	%	20.95±0.23	23.12±0.13	29.75±0.75	16.6±0.50
APO2.7	нг/мл	23.60±0.46	25.20±0.32	37.90±0.90	4.51±0.55

Таблиця 3

Показники мітохондриальних маркерів апоптозу в залежності від строків лікування з використанням базисної терапії (M±m)

Показники	Од. вим.	2 міс (n=22)	4 міс (n=17)	6 міс (n=21)	Здорові (n=15)
CD95	10 ⁹ /л	0.89±0.01	0.86±0.01	0.82±0.01	0.35±0.07
	%	27.55±0.75	26.55±0.75	24.55±0.75	16.6±0.50
APO2.7	нг/мл	35.6±0.90	23.5±0.40	19.5±0.30	4.51±0.55

Таблиця 4

Показники мітохондріальних маркерів апоптозу в залежності від строків лікування з використанням запропонованої терапії (M±m)

Показники	Од. вим.	2 міс (n=22)	4 міс (n=17)	6 міс (n=21)	Здорові (n=15)
CD95	10 ⁹ /л	0.57±0.21	0.38±0.01	0.36±0.10	0.35±0.07
	%	21.8±0.23	19.15±0.13	17.6±0.75	16.6±0.50
АРО2.7	нг/мл	24.7±0.46	12.5±0.32	6.23±0.90	4.51±0.55

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болотная Л.А., Сербина И.М. Современная патогенетическая терапия склеродермии // Международный медицинский журнал. – 1999. - № 3. - С. 56-58.
2. Галицкий В.А. Возникновение эукариотических клеток и происхождение апоптоза // Цитология. – 2005. - Т. 47, Вып. 2. – С. 103-120.
3. Кубанова А.А., Тихонова Л.И. Дерматовенерология в России. Реальность и перспективы // Вестн. дерматол. венерол. - 2004. - № 2. - С. 4.
4. Новикова Л.А., Бахметьев А.А. Структурно-клинические особенности склеродермии // Актуальные вопросы дерматологии, косметологии и ИППП", посвященной 10-летию кафедры кожных и венерических болезней с курсом дерматокосметологии ФУВ РГМУ / Научно-практ. конф.: Мат-лы. - М, 2003. - С. 49-50.
5. Скрипкин Ю.К., Главинская Т.А. Поражения кожи при болезнях соединительной ткани // Кожные и венерические болезни: Рук-во для врачей. В 2 томах. - Т. 2 / Под ред. Ю.К.Скрипкина. - М., 1999. - С. 481-493.

ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА, КАК КРИТЕРИИ АДЕКВАТНОСТИ ВЫБРАННОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЧАГОВОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Г.В.Николашин, В.А.Бабанин, И.Н.Кравченко, П.Н.Колбасин, Л.П.Колбасина, А.А.Писарев

Статья посвящена хроническому воспалительному заболеванию соединительной ткани – склеродермии (очаговой форме) и показателям апоптоза при этом заболевании. Предложенная терапия приводит к быстрому и явному улучшению, а так же позволяет достичь стойкой ремиссии. Результаты комплексной терапии находились в четкой зависимости от активности склеродермического процесса. Таким образом, предложенная комплексная терапия приводит к быстрому явному улучшению и позволяет достичь стойкой ремиссии.

MITOCHONDRIAL APOPTOSIS MARKERS AS ADEQUACY CRITERIA OF SELECTED THERAPY IN THE TREATMENT OF LOCALIZED SCLERODERMA

G.Nikolashin, W.Babanin, I.Kravchenko, P.Kolbasin, L.Kolbasina, A.Pisarev

Article is devoted to localized scleroderma, early diagnosis and treatment of this disease, manifestations of mitochondrial markers of apoptosis during localized scleroderma. Proposed therapy results expressed advancement and allows to achieve stable remission. The results of comprehensive therapy were in clear depending on activity scleroderma process. Thus, the proposed integrated therapy results expressed advancement and allows to achieve stable remission.