

УДК 616.12; 331.1

В. С. Недзвєцький, О. В. Курята*, С. В. Кириченко, О. О. Кєлюх

Дніпропетровський національний університет,
Дніпропетровська державна медична академія*

ПІДВИЩЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКА КЛІТИННОЇ АДГЕЗІЇ NCAM/CD56 У ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ

Ціль дослідження: оцінити характер змін нейроспецифічного білка клітинної адгезії NCAM/CD56 у хворих на гіпертонічну хворобу з різними варіантами перебігу хвороби. У хворих на АГ виявлене підвищення вмісту NCAM/CD56 у мембранній фракції лімфоцитів у порівнянні з практично здоровими особами. Найбільший рівень зареєстрований для групи пацієнтів із ГБ II стадії з проявами ДЕП. Пріоритетну роль змін з боку головного мозку в динаміку показника NCAM/CD56 підтверджує достовірне розходження між групами пацієнтів з перевагою порушень ЦНС (ДЕП, інсульт) і структурними порушеннями міокарда (ГЛЖ, інфаркт міокарда). Подальше вивчення NCAM/CD56 при ГБ перспективне в якості ймовірного прогностичного маркера клінічного варіанта розвитку захворювання.

The purpose of an examination: to estimate character of changes neurospecific protein of cell adhesion NCAM/CD56 into lymphocyte membrane from the patients with idiopathic hypertension with various variants of illness current. The results shown that the hypertensive patients have a rising of NCAM/CD56 content in membranous fraction of lymphocytes that is detected in comparison with practically healthy person. The greatest level is registered for group the patient with hypertension II stages with with manifestations DEP. The further investigation of NCAM/CD56 in cell membrane fraction of patients with hypertension is perspective as probable prognostic marker of clinical variant of disease development.

Адгезія є винятково важливою в процесах формування, у розвитку і функціонування всіх типів клітин у нормі і при патологіях [1]. У даний час інтенсивно вивчається роль молекул клітинної адгезії в патогенезі серцево-судинних захворювань [12; 16]. Артеріальна гіпертензія (АГ) є найбільш розповсюдженою серцево-судинною патологією у світі в дорослій популяції і, за даними ВООЗ, реєструється в 15–30% дорослого населення [3].

Цереброваскулярні ускладнення багато в чому визначають прогноз хворих АГ. Головний мозок є одним з основних органів-мішеней при АГ [8]. Взаємозв'язок між нейронами в центральній нервовій системі здійснюється за допомогою нейрональних молекул клітинної адгезії (*neural cell adhesion molecule* – NCAM) [5]. Мембранний глікопротеїн CD56 експресується на всіх лімфоцитах, що здійснюють генетично нерестрикований лізис кліток-мішеней. CD56/NCAM антиген (140 кДа) є ізоформою молекули адгезії нервових клітин і належить до імуноглобулінового суперсімейства САМ. Він виявляється в різних сайтах, включаючи нервову тканину, нейром'язові пластинки, нейроендокринні й ендокринні органи [13; 24]. CD56 також виступає антигеном диференціації натуральних кілерів (НК клітин) [21].

Відповідно до результатів Фремінгемського дослідження підвищення артеріального тиску супроводжується збільшенням ризику виникнення інсультів у 5–30 разів [25]. Інсульт у даний час – одна з ведучих причин смертності в розвинутих країнах [4; 9], тому, безумовно, є актуальним пошук маркерів раннього прогнозування імовірності розвитку клінічних станів у хворих на АГ. В даний час немає даних про зміну вмісту NCAM/CD56 у хворих на АГ.

Ціль даного дослідження – оцінка характеру змін NCAM/CD56 у мембранній фракції лімфоцитів у хворих на АГ з різним клінічним варіантом перебігу захворювання.

© Недзвєцький В. С., Курята О. В., Кириченко С. В., Кєлюх О. О., 2005

Матеріали і методи

Вміст NCAM/CD56 у мембранній фракції лімфоцитів визначали методом імуноблотинга з використанням моноспецифічної кролячої антисироватки проти NCAM/CD56 («Sigma») як це описано раніше [2]. Лімфоцити виділяли із суспензії клітин після центрифугування в градієнті щільності верографін-фікол [20]. Вміст загального білка в екстрактах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера [23]. Відносну інтенсивність поліпептидних зон оцінювали за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотинга.

Пацієнти були розділені на 4 групи: першу склали 8 пацієнтів із АГ II стадії і поразкою головного мозку (гіпертензивною дисциркуляторною енцефалопатією I, II стадій) і змінами на дні ока, друга група – 6 пацієнтів з гіпертрофією лівого шлуночка (ГЛШ); третя – 8 хворих на АГ III стадії при достовірному підтвердженні інсульту в анамнезі (1–10 років); четверта – 7 пацієнтів з АГ III стадії з постінфаркtnим кардіосклерозом. Групу контролю склали 7 практично здорових осіб без обтяженої спадковості, приблизно рівні за статтю і віком. Гіпертензивна дисциркуляторна енцефалопатія верифікована на підставі висновку невропатолога і підтверджувалася магнітно-резонансним дослідженням. ГЛШ оцінювали відповідно до загальноприйнятих критеріїв [4].

Усім хворим з АГ проводилася магнітно-резонансна томографія на апараті Magnetom P8 (SIEMENS, Німеччина). Статистичну обробку даних здійснювали шляхом проведення кореляційного аналізу і визначення вірогідності розходжень середніх величин за допомогою t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення

В усіх досліджених групах хворих на АГ II і III стадії виявлене достовірне підвищення рівня нейроспецифічного білка NCAM/CD56 в лімфоцитах у порівнянні з практично здоровими особами (рис. 1).

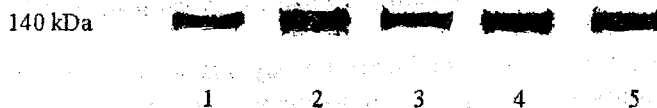


Рис. 1. Імуноблотинг мембранних фракцій лімфоцитів з анти-NCAM:
1 – контрольна група, 2 – перша група, 3 – друга група, 4 – третя група, 5 – четверта група.

При цьому рівень змін коливався і був максимальним у першій групі, перевищуючи значення щодо групи практично здорових осіб на 33,9% ($P < 0,001$), мінімальним – у третій групі – 76,2% ($P < 0,01$). Розходжень між АГ пацієнтами з ідентичною клінічною симптоматикою не виявлено. Привертає увагу різна спрямованість динаміки показників у групах відносно прогресу захворювання, що залежить від супутніх порушень з боку нервової або серцево-судинної системи по стадіях захворювання: рівень NCAM/CD56 переважав у першій групі в порівнянні з третьою на 33,7% ($P < 0,01$) і в четвертій – до другої на 17,5% ($P < 0,1$). При ГБ II стадії з проявами ДЕП виявлене достовірне підвищення вмісту NCAM/CD56 у лімфоцитах стосовно пацієнтів із ГЛШ на 67,2% ($P < 0,01$) і ІБС (постінфарктний кардіосклероз) у четвертій групі – 42,2% ($P < 0,01$). Виявлені розходження, імовірно, відбивають пріоритетний вплив на рівень NCAM/CD56 змін з боку ЦНС. Для підтвердження даного припущення пацієнти були об'єднані за принципом домінуючого клінічного варіанта перебігу захворювання: головний мозок (ДЕП, перенесена судинна катастрофа),

серце (гіпертрофія лівого шлуночка, інфаркт міокарда) (рис. 2). В обох підгрупах зафіксоване достовірне підвищення NCAM/CD56 у порівнянні з практично здоровими особами на 104,9% ($P<0,05$) і 51,2% ($P<0,05$) відповідно. Вміст NCAM/CD56 у мембранній фракції лімфоцитів вірогідно перевищував у пацієнтів із клінічними проявами порушень з боку головного мозку щодо іншої категорії хворих на 35,0% ($P<0,01$).

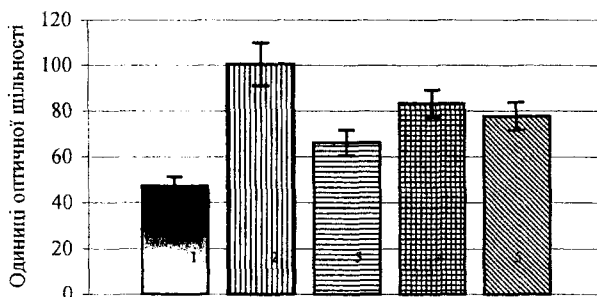


Рис. 2. Вміст NCAM/CD56 у хворих на ГХ:

1 – контрольна група, 2 – перша група, 3 – друга група, 4 – третя група, 5 – четверта група

Для підтвердження виявленої тенденції використовували статистичний метод оцінки – χ^2 критерій Пірсона, що склав 68,36, перевищуючи табличний рівень (41,34 ; $P<0,05$). Це свідчить про достовірний вплив на обумовлені характеристики запропонованого принципу поділу на групи. Виявлене підвищення рівня NCAM/CD56 у другій і четвертій групі, на нашу думку, пов'язане з ГЛЖ і збільшенням контактів нервова система – міокард, на що вказують кореляційні зв'язки між вмістом NCAM/CD56 і ЗСЛЖ ($r = 0,82$; $P<0,05$); КДО ($r = -0,89$; $P<0,05$); КСР ($r = -0,65$; $P<0,05$). З іншого боку, не виключено, що підвищення рівня NCAM/CD56 у лімфоцитах при ГБ II стадії в пацієнтів із проявленням ГЛЖ, інфарктом міокарда обумовлено порушеннями з боку головного мозку.

Збільшення вмісту NCAM/CD56 у пацієнтів із ГБ асоціювалося з порушеннями головного мозку ($r=0,62$; $P<0,05$), за даними магнітно-резонансної томографії (МРТ), які відповідають проявам дисциркуляторної енцефалопатії. Найбільший рівень NCAM/CD56 виявлений у хворих з ДЕП і, відповідно, у них спостерігалися найбільш виражені зміни відділів головного мозку: у 2-х хворих виявлялося ізольоване розширення шлуночкової системи мозку, у 3-х – розширення бічних шлуночків у сполученні з вузькими зонами гіперінтенсивності навколо них і підвищенням T2 сигналів. У пацієнтів з АГ, які не мають змін з боку головного мозку, за даними МРТ, вміст NCAM/CD56 був вірогідно меншим, ніж у хворих з наявністю таких змін ($p<0,01$). Серед хворих з високим рівнем NCAM/CD56 спостерігалася обтяжена спадковість у 64,2%, з них по лінії матері 57,1% і по лінії батька 21,4%.

Функції глікопротеїну NCAM/CD56 розкриті далеко не цілком, однак участь у клітинній адгезії і присутність на клітинах деяких пухлин дозволяють розглядати цей антиген як біологічний маркер патологічних станів [7]. Передбачається також, що для деяких NCAM/CD56-позитивних лімфоцитів може відбуватися інфільтрація в ЦНС і внаслідок цього – розвиток патогенетичних порушень мозку [15].

Після тимчасової ішемії мозку кількість клітин, що експресують NCAM, збільшується в гіпокампі. Існують дані про можливості використання нейроспецифічних білків NSE і NCAM як прогностичних маркерів інсульту й інфаркту [11; 19]. Однак не виявлено кореляції між ступенем ішемічних ушкоджень мозку після сер-

цевого удару і вмістом NCAM у сироватці крові [19]. З іншого боку, при ішемії й ушкодженнях кори головного мозку виявлене збільшення мРНК NCAM140 в астрогліальних клітинах [17].

Ішемія мозку, викликана порушенням кровотоку, ініціює каскад подій, що ведуть до загибелі клітин і неврологічних дисфункцій. При цьому гліальні клітини виявляють більш масову загибель, ніж нейрони [11]. При тимчасовому порушенні кровотоку в центральній артерії мозку вже за 90 хв виявляється більш інтенсивна експресія NCAM. Ці зміни спостерігаються протягом від 1 до 3 днів [14]. Експресія адгезивних молекул модулюється тимчасовою глобальною ішемією і спостерігається короткочасно в нейронах, але більш тривала в гліальних клітинах. Така реакція астроглії на ушкодження може бути одним з механізмів пластичності ЦНС [11]. У локально ушкоджених ішемічних ділянках мозку процес репарації включає три етапи: проліферацію, міграцію і диференціацію клітин [18]. Після ішемії тривалий період (до 2-х місяців) спостерігається міграція стовбурових поліпотентних клітин і їх диференціація [18]. Пропонується використовувати як маркери міграції адгезивні білки (зокрема NCAM) і цитоскелетний білок проміжних філаментів астроцитів GFAP як маркер проліферації і диференціації [1; 10].

Безліч факторів різної природи може впливати на переключення експресії NCAM. У свою чергу порушення експресії NCAM веде до виникнення широкого кола патологій. Наприклад, дисрегуляція NCAM, асоційована із синаптичними порушеннями і наступними функціональними патологіями нервової системи. Таким чином, отримані результати свідчать про кореляцію змін вмісту молекули клітинної адгезії NCAM/CD56 у мембранній фракції лімфоцитів і пошкодженнями ЦНС у хворих на гіпертонічну хворобу. На нашу думку, вивчення NCAM/CD56 перспективне в якості ймовірного прогностичного маркера клінічного варіанта перебігу захворювання.

Висновки

1. У хворих на артеріальну гіпертензію спостерігається підвищення вмісту NCAM/CD56 у мембранній фракції лімфоцитів у порівнянні з практично здоровими особами без обтяженого анамнезу.

2. При АГ найбільший рівень NCAM/CD56 виявлений у хворих з дисциркуляторною енцефалопатією, яка підтверджена результатами магнітно-резонансної томографії головного мозку.

Бібліографічні посилання

1. Жерносков Д. Д. Взаємодія білків адгезії зі структурними складовими цитоскелета тваринних клітин / Д. Д. Жерносков, В. С. Недзвєцький // Укр. біохім. журн. – 1998. – 70. – 1. – С. 3–14.
2. Курята А. В. Гипертоническая болезнь и содержание белка клеточной адгезии NCAM/CD56 в мембранах лимфоцитов / А. В. Курята, В. С. Недзвєцький, Ю. В. Егорова // Укр. кардіологічний журнал. – 2003. – № 3. – С. 56–60.
3. Сіренко Ю. М. Артеріальна гіпертензія. – К.: «Моріон», 2001.
4. American Heart Association. Heart and stroke facts. Statistics: 1997 statistical supplement. – Dallas: American Heart Association, 1997.
5. Asmi M. H. A practical guide to echocardiography / M. H. Asmi, M. J. Walsh. – Chapman & Hall Medical. – London, 1995. – 260 p.
6. Baydas G. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex / G. Baydas, V. S. Nedzvetsky, P. A. Nerush et al. Neurosci Lett., 2002. – Vol. 326, № 2. – P. 109–112.

7. **Di Bona E.** Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia / E. Di Bona, R. Sartori, M. Zambello et al. // *Haematologica*, 2002. – Vol. 41, № 1. – P. 34–38.
8. **Dyken M. L.** Risk factors in stroke. A statement for physicians by the Subcommittee on Risk Factors and Stroke of the Stroke Council / M. L. Dyken, P. A. Wolf, Y. J. M. Barnett et al. // *Stroke*, 1984. – Vol. 15. – P. 1105–1111.
9. **European Stroke Initiative Recommendations.** Ischemic Stroke. Prophylaxis and treatment. – EUSI, 2000. – 18. – P. 11.
10. **Fern R.** Intracellular calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes in situ. // *J. Neurosci.* – V. 18, № 18. – P. 7232–7243.
11. **Fox G. B.** The modulations of NCAM polysialylation state that follow transient global ischemia are brief on neurons but enduring on glia / G. B. Fox, C. Kjoller, K. J. Murphy et al. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2001. – Vol. 60, № 2. – P. 132–140.
12. **Fong Ignatius W.** Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. // *CMAJ*. – 2000. – Vol. 163(1). – P. 49–56.
13. **Franceschini I.** Polysialyltransferase ST8Sia II (STX) polysialylates all of the major isoforms of NCAM and facilitates neurite outgrowth / I. Franceschini, K. Angata, E. Ong et al. // *Glycobiology*, 2001. Vol. 11(3). – P. 231–239.
14. **Hayashi T.** Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* / T. Hayashi, T. Seki, K. Sato et al. – 2001. – Vol. 907, № 1–2. – P. 130–133.
15. **Hashiguchi T.** T-cell leukemia cells which express neural cell adhesion molecule (NCAM) and infiltrate into the central nervous system / T. Hashiguchi, M. Tara, K. Niina et al. // *Intern. Med.*, 2002. – Vol. 41, № 1. – P. 34–38.
16. **Hoffmeister H.M.** Activation of inflammatory pathways in acute coronary syndromes / H. M. Hoffmeister, S. Kozmaier et al. // *Eur. Heart J.*–2000.–21: 656.
17. **Jucker M.** Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia / M. Jucker, C. Mondadori, H. Mohajeri. // *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1995. – Vol. 28, № 1. – P. 149–156.
18. **Iwai M.** Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia / M. Iwai, K. Sato, N. Omori et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.*–2002. – Vol. 22(4). – P. 411–419.
19. **Karkela J.** CSF and serum brain-specific creatine kinase isoenzyme (CK-BB), neuron-specific enolase (NSE) and neural cell adhesion molecule (NCAM) as prognostic markers for hypoxic brain injury after cardiac arrest in man / J. Karkela, E. Bock, S. J. Kaukinen. // *Neurol. Sci.*–1993. – Vol. 116, № 1. – P. 100–109.
20. **Koreck A.** CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis / A. Koreck, A. Suranyi, B. J. Szony. // *Clin Exp Immunol.*–2002. – Vol. 127(1). – P. 176–82.
21. **Lanier L. I.** Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56) / L. I. Lanier, C. Chang, M. Azuma // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146. – P. 4421–4426.
22. **Li H.** An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium / H. Li, M. I. Gybulsky, M. A. Gimbrone, P. Libby // *Arterioscler. Thromb.* – 1993; 13: 197–204
23. **Miller G. L.** Protein determination for large numbers of samples, *Anal. Chem.*, 1959. – Vol 31, № 5. – P. 964–966.
24. **Ronn L.C.** The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system / L. C. Ronn, B. P. Hartz, E. Bock. // *Exp. Gerontol.* – 1998. – Vol. 33(7–8). – P. 853–64
25. **Stokes J. III** Blood pressure as a risk factor for cardiovascular disease / J. III. Stokes, W. B. Kannel, P. A. Wolf et al. The Framingham study – 30 years of follow-up. // *Hypertension*, 1989. – Vol. 13 (suppl 1). – P. 113–118.

Надійшла до редакції 04.01.05