

Яременко Л.М.<sup>1</sup>,  
Грабовий О.М.

## ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ СУДИННИХ УРАЖЕНЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, Київ;

<sup>2</sup>Національний інститут раку, Київ

**Резюме.** Судинні ураження лівої півкулі мозку, що моделювалися в щурів, призводять до змін стану популяції лімфоцитів, ступінь виразності яких, у цілому, залежить від тяжкості ураження та сенсibiliзації до антигенів мозку. Вони супроводжуються зниженням спонтанної та індукованої мітогенами реакції бласттрансформації лімфоцитів, що значною мірою можна розглядати як результат травматичного стресу, та відносним посиленням відповіді на антигени мозку та тимусу, що свідчить про системну зміну спрямованості функціональної активності лімфоцитів. Імунофан, застосований у щурів з тяжкими порушеннями гемоциркуляції у лівій півкулі мозку, призводить до зменшення виразності змін функціональних властивостей лімфоцитів.

**Ключові слова:** лімфоцити, мозок, ішемія, імунофан.

Порушення кровопостачання головного мозку, який є забар'єрним органом, супроводжується змінами імунної системи, що можуть виступати як захисними, так й факторами, що підтримують нейродегенеративні та пригнічують відновні процеси [5, 6].

Активовані антигенами нервової тканини Т- та В-лімфоцити проникають через гемато-енцефалічний бар'єр за участю молекул адгезії, експресованих на ендотелії судин головного мозку [6, 7]. Імунокомпетентні клітини (макрофаги, Т- та В-лімфоцити, нейтрофіли) взаємодіють з антиген-презентуючими клітинами мозку (мікроглією, астроглією), які індукують специфічну імунну відповідь, зокрема, продукують про- та протизапальні фактори [7, 11]. Тому важливе значення при судинно-обумовленій патології мозку набуває корекція не тільки відповідних гемодинамічних та неврологічних, а й імунних розладів [5, 6, 7].

**Метою** даної роботи було вивчення змін функціональної активності лімфоцитів периферичної крові при моделюванні порушень кровопостачання лівої півкулі головного мозку різного ступеня тяжкості та їх корекції імунофаном.

### Матеріали та методи

Дослідження проведені на 160 білих статевозрілих щурах лінії Вістар вагою 260–290 г, які утримувалися на стандартному раціоні в віварії НМУ імені О.О.Богомольця. Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до положень "Загальних етичних

принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), а також керувалися положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985). У досліджах використовувалися тільки самці щурів, оскільки рівень естрогенів впливає на перебіг ішемічного інсульту [12].

Тварини, використані в досліді, були поділені на 5 груп: 1 група – контроль (К), тварини, які не зазнавали ніяких дій (n=10); 2 група (ПО) – псевдооперовані, щурам виконувалася доступ до лівої загальної сонної артерії й її мобілізація, після чого рана зашивалася (n=35); 3 група (ПСА) – з перев'язаною сонною артерією, після доступу до лівої сонної артерії та її мобілізації в неї вводилося 0,2 мл фізіологічного розчину та накладалася шовкова лігатура (n=35); 4 група (МЕА) – з мікроемболізацією кровоносних судин лівої півкулі головного мозку, (n=35). Емболізація виконувалася введенням у ліву сонну артерію суспензії ізольованих жирових клітин щура з наступною її перев'язкою, що приводило до розвитку важкого ушкодження головного мозку [2]; 5 група (МЕА+ім) – тварини з МЕА, які отримували по 0,5 мкг імунофану (НВП "Бионокс", Росія) на 1–10, 21–23, 30–32, 50–51 дні експерименту (n=35). Всі оперативні втручання виконувалися під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Кров для досліджень забиралася через 1, 3, 10, 30 і 90 діб після початку досліді після евтаназії



тварин введенням надмірної дози тіопенталу жатрію (200 мг/кг).

Функціональну активність лімфоцитів визначали за допомогою реакції бласттрансформації (РБТЛ) [4] з поліклональними мітогенами та тканинними антигенами сірої й білої речовини головного мозку та тимусу з використанням середовища 199 та 10% ембріональної пелячої сироватки (Биолот, Россия). Поліклональними неспецифічними мітогенами для Т-лімфоцитів слугували: конконовалін А (Кон А) Sigma та фітогемаглютинін (ФГА) Sigma, для В-лімфоцитів – ліпополісахарид (ЛПС) E.coli Sigma в кінцевому розведенні 10, 100 та 20 мкг/мл відповідно. Водно-сольові тканинні екстракти із сірої (СР) та білої речовини (БР) головного мозку готували за загальноприйнятій методики [9]. Перед постановкою РБТЛ попередньо антигени приводились до одного показника за вмістом білку. Оптимальна концентрація антигену підбиралась шляхом постановки РБТЛ з різними розведеннями і становила 0,24–0,3 мг/мл. Підрахунок бластоподібних клітин проводили цитоморфологічним методом. Отримані результати оброблялися стандартними статистичними методами:  $M \pm m$ ;  $p \leq 0,05$

#### Результати та обговорення

Проведені дослідження показали, що у ПО шурів (Табл. 1) спонтанна РБТЛ достовірно підвищувалася у 1,5 рази через 3 доби після операції. Реакційна здатність лімфоцитів на всі використані мітогени у тварин цієї групи виявлялася зниженою протягом усього періоду експерименту та проявляла тенденцію до зростання у відповідь на дію антигенів головного мозку та тимусу (Табл. 2).

У шурів з ПСА (Табл. 1) пікове підвищення спонтанної РБТЛ спостерігалось через 1 добу після операції. Як і у тварин контрольної групи в них визначалося в цілому зменшення виразності реакції на мітогени. Але, при дії ФГА реєструвалася менш значна, ніж при ПО, депресія РБТЛ через 1 і 3 доби після травми, та удвічі більша через 90 діб. За цих умов реакція В-лімфоцитів на мітоген була виразнішою, ніж при ПО, через 3 доби досліду, а через 90 – удвічі слабшою. ПСА, у порівнянні з ПО, супроводжувалася зменшенням виразності РБТЛ на СР мозку у відновлювальний період порушень кровообігу (10, 30 і 90 діб), достовірним зростанням реакції на БР через 1, й зниженням через 90 діб експерименту (Табл. 2). У відповідь

на дію антигенів тимусу спостерігалось збільшення, у порівнянні з ПО, відсотку утворення бластів у післяопераційний та зниження у пізній відновний періоди.

При МЕА визначалося виразне зменшення спонтанної РБТЛ через 1 добу після відтворення емболії (Табл. 1). У відповідь на дію Кон А лімфоцити тварин цієї групи виявляли, починаючи з 3 доби після втручання, меншу реакційну властивість ніж при ПО і ПСА. Реакція лімфоцитів на ФГА також як і в інших групах зменшувалася, але через 1 і 3 доби менш значно. При дії ЛПС на В-лімфоцити за умов МЕА не спостерігалось достовірних у порівнянні з ПСА відмінностей у виразності РБТЛ. Через 1 добу після відтворення ішемії фіксувалося максимальне підвищення відсотку утворення бластів у відповідь на дію тканинного антигену СР, який поступово зменшується і через 30 діб набував свого мінімуму. На тканинний антиген БР РБТЛ демонструвала нерівномірне протягом експерименту підвищення з піками через 1, 10 і 90 діб після початку (Табл.2). На дію антигену тимусу у тварин з МЕА реєструвалася зростання РБТЛ протягом усього терміну експерименту, на відміну від інших дослідних груп.

Імунофан, застосовний у тварин з МЕА (Табл.1), призводив інверсії змін спонтанної РБТЛ, яка демонструвала максимум через 1 добу після емболії, а у подальшому ставала меншою за контрольні значення. За умов дії імунофану спостерігалася тенденція до збільшення РБТЛ у відповідь на Кон А і ФГА у відновлювальний період ушкодження мозку. З ЛПС, навпаки, спостерігалася деяка депресія утворення бластів у ранній післяопераційний період. Через 1–10 діб відмічалось також зменшення виразності РБТЛ на антиген СР мозку, хоча через 90 діб її значення ставало майже вдвічі більшими за контрольні (Табл. 2). Реакція лімфоцитів на антиген БР у тварин, що отримували імунофан, достовірно не відрізнялася від контрольних значень. Введений антиген тимусу у тварин цієї групи, на відміну від МЕА, не призводив до достовірного підвищення реактивності лімфоцитів через 1 і 3 доби після відтворення мікроемболії.

Таким чином, різноманітні за ступеню тяжкості порушення мозкового кровообігу (з урахуванням операційної травми) в цілому призводять до пригнічення реакції бласттрансформації як спонтанної так і під впливом міто-



ТАБЛИЦЯ 1

РЕАКЦІЇ БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ НА ДІЮ МІТОГЕНІВ ПРИ ІШЕМІЧНИХ УШКОДЖЕННЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ТА КОРЕКЦІЇ ІМУННОГО СТАТУСУ МУНОФАНОМ ( $M \pm m$ )

К	Доба	ПО	ПСА	МЕА	МЕА+ім
Спонтанна РБТЛ (%) 4,2±0,2	1	3,6±0,4*	4,75±0,5*	3,09±0,3*	4,5±0,4*
	3	6,12±0,4*	4,43±0,3*	4,6±0,4	3,8±0,4*
	10	3,7±0,3*	4,25±0,3*	3,56±0,7*	3,5±0,5
	30	4,25±0,3	3,44±0,16	4,07±0,3*	3,33±0,36*
	90	3,0±0,2*	4,25±0,4*	3,33±0,5*	3,33±0,19
РБТЛ з Кон А (%) 37,73±3,21	1	16,4±0,7*	15,25±1,8	14,36±1,24	17,08±1,53*
	3	20,0±1,7*	21,3±1,68	17,7±2,76*	16,33±2,43*
	10	17,54±1,3*	17,25±1,08	13,33±2,35*	16,5±1,33*
	30	12,25±0,9*	14,78±1,36*	12,33±1,44*	13,67±0,9
	90	17,4±1,06*	14,5±1,94*	8,67±1,76*	16,0±1,82*
РБТЛ з ФГА (%) 33,73±3,63	1	15,2±1,25*	18,5±2,03	19,36±1,53	17,83±1,49
	3	13,6±0,7*	17,57±0,5*	19,8±2,23*	14,66±1,34*
	10	20,8±1,07*	20,5±1,39	20,63±4,52	29,83±3,0*
	30	10,0±0,9*	11,78±3,28	13,33±1,19*	16,75±2,02*
	90	26,6±1,97*	10,75±2,39*	17,67±1,63*	19,67±1,63*
РБТЛ з ЛПС (%) 28,93±2,67	1	15,6±2,1*	16,25±1,36	17,64±1,31	15,67±1,57*
	3	16,62±1,5*	20,57±2,1	20,9±2,64	12,17±1,24*
	10	24,1±1,2*	19,88±1,12*	18,56±2,19	22,0±1,13*
	30	17,51±1,16*	16,77±1,17	16,4±1,19	17,92±1,44
	90	22,2±1,46*	10,75±2,17*	12,0±1,53*	9,67±1,55*

К – контроль; ПО – тварини, яким виконана псевдооперація; ПСА – тварини, яким виконана перев'язка лівої сонної артерії; МЕА – тварини, яким виконана мікроемболія адипоцитами в басейні лівої сонної артерії; МЕА+ім – тварини з МЕА, які отримували імунофан. \*)  $p \leq 0,05$  у порівнянні з попередньою дослідною групою на тому ж терміні спостереження.

генів. Враховуючи вищезазначене, можна вважати, що депресія похідної реактивності лімфоцитів є реакцією на стрес [5, 6], обумовлений травмою.

Слід зазначити, що депресія спонтанної РБТЛ та, головним чином, у відповідь на дію мітогенів зберігається на тлі відновлення абсолютної кількості лімфоцитів, після лімфопенії у ранній післяопераційний період [10]. Виявлена відносно менша депресія РБТЛ В-, ніж Т-лімфоцитів, співпадає зі змінами абсолютної кількості цих клітин у периферичній крові при порушеннях мозкового кровообігу. Деструктивні явища у мозку супроводжуються поглибленням супресії РБТЛ з Кон А і відносним зростанням з ФГА, що підтверджує неоднозначність реакцій різних субпопуляцій Т-лімфоцитів на ішемічне ушкодження мозку [11, 15]

На тлі пригнічення реакції лімфоцитів на мітогени при порушеннях мозкового кровообігу спостерігається посилення їх відповіді на дію тканинних антигенів мозку та тимусу.

Причому збільшення тяжкості ішемії веде до більш значного зростання реакції лімфоцитів на антигени БР, ніж СР. Крім того, деструктивні процеси у мозку супроводжуються майже в 2 рази зростанням реакції лімфоцитів на антигени тимусу, що вказує на залучення у процес органів імунної системи [14].

Застосування імунофану, який корегує імунні та окисно-антиоксидантні порушення [8] при модельованому інфаркті мозку призводить до зменшення виразності функціональних змін у популяції лімфоцитів при ішемічних ураженнях мозку. Це проявляється відносним збільшенням функціональної активності Т-лімфоцитів, у відповідь на дію неспецифічних та специфічних стимуляторів та менш значним зростанням бластоутворення В-лімфоцитів. Зменшення кількості В-лімфоцитів [10] та їх супресія при застосуванні імунофану в використаних моделях не призводило до порушень відновлювальних процесів, як це спостерігалось при В-клітинному дефіциті [15].



ТАБЛИЦЯ 2

РЕАКЦІЇ БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ НА ДІЮ ТКАНИННИХ АНТИГЕНІВ ПРИ ІШЕМІЧНИХ УШКОДЖЕННЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ТА КОРЕКЦІЇ ІМУННОГО СТАТУСУ МУНОФАНОМ ( $M \pm m$ )

РБТЛ з антигенами сірої речовини головного мозку (%) 11,36±0,56	1	8,8±1,04*	10,5±1,23	13,64±1,12*	11,67±1,32
	3	15,25±1,5*	15,42±1,17	12,0±2,59*	11,33±2,1
	10	16,28±1,43*	13,38±1,06	12,67±2,46	9,67±1,73*
	30	14,5±0,5*	10,78±1,1*	9,13±1,09	11,25±1,13
	90	13,4±1,15	10,75±1,38	12,66±2,23	20,0±1,98*
РБТЛ з антигенами білої речовини головного мозку (%) 10,82±1,01	1	9,0±1,07	13,0±1,1*	14,36±1,12	11,42±1,12
	3	11,5±0,9	11,85±1,17	11,1±1,08	11,66±0,65
	10	16,14±1,3	16,0±1,7	14,0±2,88*	10,17±2,05*
	30	10,75±0,8	11,44±1,04	11,13±1,3	12,25±1,38
	90	15,25±0,96*	10,0±1,35*	16,0±1,66*	11,17±1,6*
РБТЛ з антигенами тимусу (%) 8,8±0,83	1	7,6±0,51	11,25±0,9*	15,0±1,43*	11,25±0,82*
	3	11,12±0,8	12,0±0,8	15,1±1,72*	9,17±1,35*
	10	10,5±0,5	16,25±1,19*	16,78±2,16	16,5±2,05
	30	14,0±1,2*	9,77±1,07*	13,75±1,88*	14,11±1,3
	90	19,2±1,32*	9,25±2,25*	11,33±1,67*	12,67±2,29

К – контроль; ПО – тварини, яким виконана псевдооперація; ПСА – тварини, яким виконана перев'язка лівої сонної артерії; МЕА – тварини, яким виконана мікроемболія адипоцитами в басейні лівої сонної артерії; МЕА+ім – тварини з МЕА, які отримували імунофан. \*)  $p \leq 0,05$  у порівнянні з попередньою дослідною групою на тому ж строку спостереження.

#### Висновки:

1. Судинні пошкодження у лівій півкулі мозку, що моделювалися в щурів, призводять до змін стану популяції лімфоцитів, ступінь виразності яких, у цілому, залежить від тяжкості ураження та сенсибілізації до антигенів мозку.
2. Судинні порушення у лівій півкулі мозку, що моделюються у щурів, супроводжуються зниженням спонтанної та індукованої мітогенами реакції бласттрансформації лімфоцитів, що значною мірою

можна розглядати як результат травматичного стресу, та відносним посиленням відповіді на антигени мозку та тимусу, що свідчить про системну зміну спрямованості функціональної активності лімфоцитів.

3. Імунофан, застосований у щурів з тяжкими порушеннями гемоциркуляції у лівій півкулі мозку, призводить до зменшення виразності змін функціональних властивостей лімфоцитів.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СОСУДИСТЫХ ПОРАЖЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Л.М. Яременко, А.Н. Грабовой

**Резюме.** Сосудистые поражения левого полушария мозга, моделируемые у крыс, приводят к изменению состояния популяции лимфоцитов, степень выраженности которых, в целом, зависит от тяжести поражения и сенсибилизации антигенами мозга. Они сопровождаются снижением спонтанной и индуцированной митогенами реакции бласттрансформации лимфоцитов, что в значительной мере можно рассматривать как результат травматического стресса, и относительным усилением ответа на антигены мозга и тимуса, что свидетельствует о системном изменении направленности функциональной активности лимфоцитов. Имунофан, примененный у крыс с тяжелыми нарушениями гемоциркуляции в левом полушарии мозга, приводит к уменьшению выраженности изменений функциональных свойств лимфоцитов.

**Ключевые слова:** лимфоциты, мозг, ишемия, имунофан.



## THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYMPHOCYTES AT MODELLING OF BRAIN VASCULAR LESIONS

Yaremenko L.M., Grabovoy A.N.

**Abstract.** The vascular lesions of the left cerebral hemisphere modelled for rats, result in to a change of state of lymphocytes population which degree of manifestation, as a whole, depends on gravity of a lesion and a sensibilization brain antigens. They are accompanied by decrease of spontaneous and mitogens induced of a lymphocyte transformation assay, that appreciably it is possible to survey as outcome of traumatic stress, and to the relative magnification of the answer to brain and thymus antigens, that testifies to a system modification of a trend of lymphocytes functional activity. Imunofan, applied for rats with serious disturbances of haemocirculation in the left cerebral hemisphere, result to decrease of change expression of lymphocytes functional properties.

**Key words:** lymphocyte, brain, ischemia, imunofan.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Ганнушкина И.В.: Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений головного мозга. - М. - 1974. - 200 с.
2. Грабовий О.М., Яременко Л.М., Панішина Н.Г. Спосіб моделювання ішемічного пошкодження мозку. Патент на корисну модель № 34604. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 11.08.2008, Бюл. №15, 2008 р.
3. Грабовий О.М., Яременко Л.М. Спосіб моделювання комбінованого судинно-імунного пошкодження мозку. Патент на корисну модель № 36843. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 10.11.2008, Бюл. № 21, 2008 р.
4. Григорьева М.П., Копелян И.И. Применение метода культивирования лимфоцитов для изучения трансплантационного иммунитета // Цитология. - 1972, №7. - С. 838-902.
5. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. - 328 с.
6. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В., Сепиашвили Р.И. Нейроиммунология. Руководство. М.: Изд-во НИИ общей патологии и патофизиологии, 2003. - 438 с.
7. Лисянский Н.И., Руденко В.А., Гнедкова И.А. и др. Имунная система головного мозга. - К., 1999. - 216 с.
8. Лебедев В.В., Шелепова Т.М., Степанов О.Г. Имунофан - регуляторный пептид в терапии инфекционных и неинфекционных болезней (Под ред. В.И. Покровского). М., 1998. - 119 с.
9. Руководство по иммунологии. Под редакцией В'язова О.Е., Ходжаева Ш.Х. - М. Издательство Медицина. - 1973. - 392 с.
10. Яременко Л.М., Грабовий О.М. Стан популяції лімфоцитів при моделюванні порушень кровообігу у лівій півкулі головного мозку у щурів та його корекція // Імунологія та алергологія (Київ). - 2009. - №1. - С. 40-44.
11. Arumugam Th.V., Granger D.N., Mattson M.P. Stroke and T-cells // NeuroMolecular Medicine. - 2005. - V. 7, N 3. - P. 229-242.
12. Hurn P.D., Macrae I.M. Estrogen as a neuroprotectant in stroke // J Cereb Blood Flow Metab. - 2000. - V. 20. - P. 631-652.
13. Nadareishvili Z. G., Li H., Wright V., Maric D., Warach S., Hallenbeck J. M., Dambrosia J., Barker J. L., Baird A. E. Elevated pro-inflammatory CD4+CD28- lymphocytes and stroke recurrence and death // Neurology. - 2004. - V. 63. - P. 1446-1451.
14. Offner H., Sandhya S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Vandenbark A.A., Hurn P.D. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. - 2006. - V. 26. - P., 654-665.
15. Yilmaz G., Arumugam Th.V., Stokes K.Y., Granger N.D. Role of T Lymphocytes and Interferon- $\gamma$  in Ischemic Stroke // Circulation. - 2006. - V. 113. - P. 2105-2112