

Влияние ронколейкина на активность системы оксида азота в головном мозге крыс с экспериментальным геморрагическим инсультом

Э.В.Супрун

Национальный фармацевтический университет
(ректор — академик АМН Украины, профессор В.П.Черных)
Харьков, Украина

Изучены вопросы участия системы оксида азота в формировании различных звеньев патогенетических изменений при геморрагическом инсульте. На модели экспериментального геморрагического инсульта у крыс (путем введения аутокрови во внутреннюю капсулу головного мозга) на фоне коррекции ронколейкином (0,01 мг/кг) в гомогенате мозга отмечена нормализация показателей цикла оксида азота (NO-синтазы, нитратов, L-аргинина), функциональной активности митохондрий (по мембранному потенциалу заряда митохондрий), показателей энергетического метаболизма (АТФ, АДФ, АМФ), а также стабилизация неврологического статуса экспериментальных животных (по шкале McGrow).

Ключевые слова: геморрагический инсульт, IL-2, ронколейкин, оксид азота.

Введение

Актуальной проблемой медицины последних десятилетий является рост заболеваемости цереброваскулярными заболеваниями, из которых наиболее тяжелой формой является геморрагический инсульт (ГИ). При ГИ происходят типичные нарушения микроциркуляции и постишемическое повреждение ткани мозга, степень повреждающего действия которого определяется тяжестью и длительностью снижения мозгового кровотока [10, 12].

Важным звеном развития постишемических патологических изменений мозговой ткани является система оксида азота. Оксид азота (NO) образуется путем пятиэлектронного окисления терминальной гуанидиновой группы L-аргинина при участии фермента NO-синтазы (NOS) в присутствии тетрагидробиоптерина, флавинов (ФАД и ФАМН), НАДФН и кислорода. Семейство NOS включает три основные изоформы, которые кодируются разными генами, — нейрональную (nNOS, или NOS-I), индуцибельную (iNOS, или NOS-II) и эндотелиальную (eNOS, или NOS-III) [5, 6]. iNOS по активности в сотни раз превышает eNOS, продуцирует гораздо большее количество NO (в микро- и наномолярных концентрациях) и имеет основное значение в процессах нейродеструкции. При ишемии NO в избыточных количествах и его дериваты играют многогранную роль в форми-

ровании каскада патогенетических изменений, ранних и поздних нейрональных потерь и клинического прогноза в целом [11, 16]. Поэтому коррекция NO-обусловленных звеньев ишемического повреждения головного мозга является перспективным направлением церебропротекции.

Известно, что степень выраженности структурно-функциональных изменений нейронов в пострадавшей области мозга уменьшается от центра к периферическим зонам пенумбры. Ишемия активирует микроглию и индуцирует реакции локального ишемического повреждения, которые определяют механизмы вторичного поражения ткани мозга — синтез провоспалительных цитокинов, формирование воспалительной реакции и дальнейшее прогрессирование постишемических изменений [1, 9]. К провоспалительным цитокинам относятся интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-8) и фактор некроза опухолей (FNO). Первым из провоспалительных цитокинов в зоне ишемии продуцируется IL-1, который также стимулирует синтез секретируемых Т-хелперами ростовых факторов — IL-2 и IL-4 [4, 18].

IL-2 участвует в формировании быстрого иммунного ответа организма — индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, активирует цитотоксические Т-лимфоциты, стимулирует естественные киллеры, генерирует лимфо-

кин-активированные киллеры (LAK). Также IL-2 стимулирует синтез и секрецию ряда других цитокинов — IL-4, IL-6, гамма-интерферона, колоний-стимулирующих факторов (CSFs), факторов роста опухолей (THFs) и, таким образом, является важным звеном формирования «цитокинового каскада» [4]. В клинической практике рекомбинантный IL-2 (ронколейкин) используется для коррекции вторичной иммунной недостаточности в комплексной терапии онкологических процессов и тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний разной этиологии [15]. Таким образом, формирование нейродегенеративных изменений при ГИ связано как с эффектами системы NO, так и с формированием «цитокинового каскада» и инициированными им реакций вторичного поражения ткани мозга.

Целью исследования было на модели экспериментального геморрагического инсульта изучить динамику показателей системы NO, функциональной активности митохондрий и энергетического обмена в головном мозге крыс, а также выраженность неврологического дефицита на фоне коррекции цитокиновым препаратом — рекомбинантным IL-2 (ронколейкин).

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на белых нелинейных крысах массой 160–200 г. Крысы получены из питомника ИФТ АМН Украины. Животных содержали на стандартном рационе вивария при естественной смене дня и ночи. Все процедуры и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с «Положением об использовании лабораторных животных в биомедицинских исследованиях». Внутримозговое кровоизлияние (ВМК) вызывали введением аутокрови во внутреннюю капсулу головного мозга под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг). Животные были разделены на три группы по 10 крыс: первая — ложнопериорированные животные (ЛО), вторая — животные с ВМК (контрольная патология — КП), третья — животные с ВМК, которым вводили ронколейкин (группа Р) в дозе 0,01 мг/кг внутримышечно сразу после выхода животных из наркоза и в дальнейшем 1 раз в сутки в течение 18 дней.

По истечении острого периода ишемии (4 дня) и фазы восстановления (18 дней) животных выводили из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации. Мозг быстро извлекали, отделяли височные доли, которые гомогенизировали в жидком азоте. В

гомогенате мозга биохимическими методами определяли активность NO-синтазы (по скорости убывания количества НАДФН⁺), содержание нитритов (по реакции Грисса) и L-аргина, уровень адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ). Также в гомогенате мозга определяли мембранный потенциал заряда митохондрий (МПЗМ) в присутствии сафронина-О. Неврологический дефицит у животных оценивали по шкале Stroke-index McGrow (тяжесть состояния по сумме соответствующих баллов) в течение острого периода ишемии и фазы восстановления — на 4 и 18 сутки. Полученные данные были проанализированы вариационно-статистическим методом с использованием критерия Стьюдента (t). Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p < 0,05$), которые отмечали как p^{LO} (относительно группы ложнопериорированных животных) или p^{KP} (относительно группы контрольной патологии).

Результаты исследования и их обсуждение

Эффекты оксида азота зависят от его концентрации. В физиологических концентрациях NO выполняет регуляторные функции — активирует растворимую гуанилатциклазу, стимулирующую синтез циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ), что обуславливает расслабление сосудов, торможение активности тромбоцитов и макрофагов. Гипоксия оказывает значительное влияние на экспрессию генов NOS, индуцируя факторы транскрипции — HIF-1, HIF-2 и NFκB. Установлено, что в условиях гипоксии уровень внутриклеточного Ca^{2+} за счет индукции и стабилизации HIF-1α тесно коррелирует с экспрессией iNOS и высвобождением NO. При этом участие NO в повреждении и гибели нейрона имеет свою специфику, определяется изоформами NOS, видом и стадией развития инсульта. Экспрессия iNOS приводит к гиперпродукции NO и токсическим эффектам его избытка для клеток, ферментов, ионных каналов и генетического аппарата [9, 17].

Токсическое действие NO при ишемии определяется его реакцией с супероксидом с образованием в клетках-мишенях активных дериватов — пероксинитрита, нитрозония, нитроксила и диазоттриоксида. Это приводит к прямому (NO с металлами — гемовое и негемовое железо гемоглобина, миоглобина, железосерных энзимов, белков и ДНК) и непрямому (нитрозония с тиольными, фенольными, гидроксильными и аминокетильными группами белков и ДНК) взаимодействию, десенситации рецеп-

торов, угнетению активности митохондриальных ферментов и фрагментации нуклеиновых кислот [11, 13].

В остром периоде ВМК в гомогенате мозга контрольных животных отмечен рост уровней метаболитов NO и активности NOS соответственно в 2,2 и 1,8 раза ($p^{ЛО} < 0,001$), при этом содержание L-аргинина было снижено на 85% ($p^{ЛО} < 0,001$). К 18 суткам в группе КП уровень метаболитов NO снизился на 7% ($p^{ЛО} < 0,001$), активность NOS и содержание L-аргинина не изменились ($p^{ЛО} < 0,001$).

Введение ронколейкина привело к стабилизации в восстановительном периоде показателей системы оксида азота у крыс с церебральной ишемией. К 18 суткам отмечено снижение количеств метаболитов NO и активности NO-синтазы практически до уровня ЛО ($p^{ЛО} < 0,01$) на фоне увеличения содержания L-аргинина в 1,7 раза относительно КП ($p^{ЛО} < 0,001$).

Доказано, что митохондрии нейронов являются значимым источником NO, в том числе за счет активации локализованной во внутренней мембране конститутивной формы митохондриальной синтазы оксида азота (mNOS). mNOS активируется при ишемии в ответ на развитие глутаматной эксайтотоксичности, поглощения митохондриями кальция и продукцию провоспалительных IL-1 β и FNO α . При этом mNOS способна даже при субоптимальных концентрациях L-аргинина продуцировать супероксид и пероксинитрит, которые нитрозилируют в митохондриях цитохром C, в результате чего он лишается способности поддерживать перенос электронов в дыхательной цепи и восстанавливаться аскорбатом. Пероксинитрит нитрозилирует также гуанин, что приводит к разрыву цепочек ДНК, мутациям и запуску процессов деструкции, в первую очередь самих митохондрий. Это приводит к открытию неселективной поры (permeability transition pore — PTP), повреждению внутренних мембран митохондрий и формированию митохондриальной дисфункции [7, 8].

В эксперименте формирование митохондриальной дисфункции изучали по показателю потенциала, который генерируется на внутренней митохондриальной мембране, в присутствии сафронина-О в качестве потенциал-зависимой метки. Образование неселективной поры митохондрий определяли по снижению мембранного потенциала заряда митохондрий (МПЗМ). В группе КП этот показатель был стабильно снижен относительно группы ЛО — на 50% на 4 сутки эксперимента ($p^{ЛО} < 0,001$) и 44% на 18 сутки ($p^{ЛО} < 0,001$), что отражает изменения митохондриального Ca²⁺ гомеоста-

за. Введение животным с ВМК ронколейкина стабилизировало возникшую деполяризацию внутренней мембраны митохондрий и мембранный потенциал, что подтверждается ростом показателя МПЗМ относительно группы КП в восстановительном периоде ($p^{КП} < 0,01$).

В условиях дефицита поступления кислорода в клетку формирование дисфункции митохондриальных ферментных комплексов (МФК) приводит к качественным изменениям входящих в состав митохондриальных ферментов железосерных центров и их функций, подавлению основного (НАД-зависимого) пути окисления субстратов в дыхательной цепи. Происходит подавление аэробного синтеза энергии и развитие биоэнергетической (тканевой) гипоксии. Таким образом, митохондриальная дисфункция является базисным механизмом энергетических нарушений и коррелирует с фазными изменениями в содержании адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), что приводит к формированию постгипоксического метаболического дисбаланса и опережает изменения других функционально-метаболических показателей жизнедеятельности клетки [14, 19].

На фоне введения аутокрови в ткани мозга контрольных животных наблюдался дисбаланс пула макроэргических фосфатов. Было отмечено значительное снижение уровней АТФ — на 67% на 4 сутки эксперимента ($p^{ЛО} < 0,001$) и на 54% к 18 суткам ($p^{ЛО} < 0,001$). Аналогично изменились уровни АДФ — снизились соответственно на 40% ($p^{ЛО} < 0,001$) и 24% ($p^{ЛО} < 0,01$). Уровень АМФ в группе КП отличался от уровней ЛО на протяжении всего эксперимента — был выше на 58% в остром периоде ($p^{ЛО} < 0,001$) и на 32% в восстановительном ($p^{ЛО} < 0,001$), что пропорционально снижению в эти периоды АТФ и, возможно, отражает его усиленный распад на фоне ишемического повреждения. Это является важным также потому, что такой рост количеств АМФ как активного прооксиданта дополнительно усиливает агрессивные последствия оксидантного стресса в постишемической зоне.

На фоне введения ронколейкина у крыс с геморрагическим повреждением ткани мозга отмечена нормализация пула макроэргических фосфатов — стабильное повышение уровней АТФ ($p^{КП} < 0,001$) и АДФ ($p^{КП} < 0,001$) на фоне выраженного снижения АМФ ($p^{КП} < 0,01$).

Формирование ВМК на фоне повышенной продукции провоспалительных цитокинов экспрессии iNOS и гиперпродукции NO приводит к токсическим эффектам его сверхколичеств — нитрозилированию ферментов дыхательной цепи митохондрий и цикла Кребса, что ведет к

истощению запасов НАД и АТФ, гибели нейронов по пути некроза или апоптоза и формированию отдаленных нейрональных потерь [2, 16].

Исследование неврологического статуса крыс по показателям шкалы McGrow показало, что тяжелые неврологические нарушения в виде маневных движений, парезов и параличей у крыс группы ЛО не наблюдались. У большинства животных группы КП в остром и восстановительном периодах церебральной ишемии наблюдались умеренно выраженные (вялость, замедленность движений, слабость конечностей, птоз) и тяжелые неврологические нарушения — маневные движения, парезы и параличи конечностей. Анализ интегрального показателя неврологических дефицитов — суммы баллов по шкале McGrow — показал его снижение к 18 суткам на 40% от показателя острого периода.

Применение ронколейкина значительно уменьшило проявления неврологических нарушений (парезов и параличей конечностей, маневных движений) — сумма баллов по шкалы McGrow в восстановительном периоде снизилась относительно показателя острого периода на 60% и была ниже группы КП на 30% ($p^{КП} < 0,05$).

Развитие ГИ сопровождается формированием взаимосвязанных звеньев патофизиологического каскада, который ведет к нарушению функционирования нервной клетки и ее смерти. Важную роль в этом играют NO-обуслов-

ленные патологические изменения, поэтому целью рациональной нейропротекции должно быть прерывание нейродеструктивных процессов, в том числе путем применения корректоров эффектов системы NO.

Данные проведенного эксперимента подтверждают, что развитие ВМК у экспериментальных животных сопровождалось типичными признаками активации системы NO — гиперпродукцией NO, активацией NOS и развитием нитрозирующего стресса, что дестабилизировало функциональную активность митохондрий, энергетический обмен и привело в итоге к выраженным неврологическим проблемам.

Выводы

На фоне применения ронколейкина в дозе 0,01 мг/кг отмечено блокирование повреждающих эффектов системы оксида азота при церебральной ишемии — снижение уровней показателей оксида азота и активности NO-синтазы, что способствовало уменьшению степени выраженности митохондриальной дисфункции, нормализации пула макроэргических фосфатов и стабилизации неврологического статуса крыс с внутримозговым кровоизлиянием. Ронколейкин оказывает выраженный комплексный церебропротекторный эффект и в перспективе может использоваться для фармакологической защиты мозга при его повреждениях, в том числе при лечении геморрагического инсульта.

Литература

1. Blum A., Miller H. Role of cytokines in heart failure // *Am. Heart. J.* — 1998. — Vol. 135. — P. 181-186.
2. Dhar-Mascareno M., Sacramo J.M. Hypoxia — reoxygenation — induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells // *Free Radic. Biol. Med.* — 2005. — Vol. 38, №10. — P. 1548-1554.
3. Ferrarese C., Mscarucci P., Zoai C et al. Increase cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke // *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* — 1999. — Vol. 19, №9. — P. 1004-1009.
4. Kim H. M., Shin H.Y., Jeong H.J. et al. Reduced IL-2 but elevated IL-4, IL-6, and IgE serum levels in patients with cerebral infarction during the acute stage // *J. Mol. Neurosci.* — 2000. — Vol. 14 (3). — P. 191-196.
5. Kleinert H., Schwarz P., Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase // *Biol. Chem.* — 2003. — 384, №10-11. — P. 1343-1364.
6. Kojda A., Cheng Y.C., Burchfield J., Harrison D.G. Dysfunctional regulations of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene // *Circulation.* — 2001. — №103. — P. 2839-2844.
7. Акопова Л.В., Сагач В.Ф. Снижение чувствительности митохондрий к Ca^{2+} -зависимому открытию поры в условиях длительной инкубации // *Укр. биохим. журнал.* — 2004. — Т. 76, №35. — С. 61-65.
8. Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Павлов С.В. и др. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином // *Международный неврологический журнал.* — 2008. — №4 (20). — С. 23-29.
9. Беридзе М.З., Урушадзе И.Т., Шакаришвили Р.Р. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. Инсульт (приложение).* — 2001. — №3. — С. 35-40.
10. Герасимова М.М., Антипина Ю.В. Роль аутоиммунного процесса в патогенезе геморрагического инсульта // *Инсульт.* — 2003. — №8. — С. 48-52.
11. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Павлов С.В. и др. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) // *Совр. пробл. токсикол.* — 2005. — №3. — С.20-26.
12. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.

13. Дубкіна О.Ю. Окислювальний стрес і окислювальна модифікація білків // Мед. хімія. — 2001. — Т. 3, №2. — С. 43-45.
14. Завалишин И.А., Захарова М.Н. Гибель нейрона — кардинальная проблема неврологии и психиатрии // Вестник Российской АМН. — 2000. — №2. — С. 28-33.
15. Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. — К.: АННА-Т, 2007. — 296 с.
16. Манухина Е.Б., Дауни Х.Ф., Маллет Р.Т. и др. Защищающие и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота // Вестник Российской АМН. — 2007. — №2. — С. 27-33.
17. Сазонтова Т.Г., Жукова А.Г., Анчишкина Н.А. и др. Фактор транскрипции HIF-1 α , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии // Вестник Российской АМН. — 2007. — №2. — С. 17-25.
18. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, №2. — С. 16-22.
19. Сковорода В.И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии // Инсульт. — 2003. — №9. — С. 20-22.

Е.В. Супрун. Вплив ронколейкіну на активність системи оксиду азоту в головному мозку щурів з експериментальним геморагічним інсультом. Харків, Україна.

Ключові слова: геморагічний інсульт, ІЛ-2, ронколейкін, оксид азоту.

Досліджені питання участі системи оксиду азоту у формуванні різних ланок патогенетичних змін при геморагічному інсульті. На моделі експериментального геморагічного інсульту у щурів (шляхом введення аутокрові у внутрішню капсулу головного мозку) на фоні корекції ронколейкіном (0,01 мг/кг) у гомогенаті мозку відзначено нормалізацію показників циклу оксиду азоту (NO-синтази, нітратів, L-аргініну), функціональної активності мітохондрій (за мембранним потенціалом заряду мітохондрій), показників енергетичного метаболізму (АТФ, АДФ, АМФ), а також стабілізацію неврологічного статусу експериментальних тварин (за шкалою McGrow).

E.V. Suprun. Influence of ronkoleukin on the activity of the nitrogen oxide system in rats brain in experimental hemorrhagic stroke. Kharkiv, Ukraine.

Key words: hemorrhagic stroke, IL-2, ronkoleukin, nitrogen oxide.

Participation of the nitrogen oxide system in formation of different links of pathogenic changes in hemorrhagic stroke were studied. On the model of experimental hemorrhagic stroke in rats (by administranion of autoblood in internal capsule of brain) on the background of correction with ronkoleukin (0,01 mg/kg) in homogenate of brain was noted normalization of indexes of nitrogen oxide cycle (NO-synthase, nitrates, L-arginin), functional activity of mitohondria (by membrane potential of charge in mitohondria), energetic metabolims index (ATP, ADF, AMF), and also stabilization of neurological status of experimental animals (by McGrow scale).

Надійшла до редакції 13.09.2010 р.