

Влияние рецепторного антагониста интерлейкина-1 на свободнорадикальное повреждение в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс

Э.В.Супрун, И.Ф.Беленичев, А.М.Ищенко

Национальный фармацевтический университет, Запорожский медицинский университет,
ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов»
Харьков, Запорожье, Украина, Санкт-Петербург, Россия

На модели необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс в гомогенате мозга изучена динамика показателей цикла азота, перекисного окисления липидов, окислительной модификации белка и антиоксидантной защиты на фоне коррекции тиотриазолином (50 мг/кг) и рецепторным антагонистом ИЛ-1 (7,5 мг/кг). Церебропротекторная активность препаратов на 4 и 18 сутки эксперимента имела отличия в периоде восстановления, более эффективным был рецепторный антагонист ИЛ-1.

Ключевые слова: ИЛ-1, рецепторный антагонист ИЛ-1, экспериментальная церебральная ишемия.

ВВЕДЕНИЕ

Последние годы продолжается рост распространенности ишемических повреждений головного мозга среди населения промышленно развитых стран. Ежегодно в странах Европы регистрируется более 500 тыс. новых случаев инсульта, из которых летально завершается каждый третий. Пациенты с инсультом нуждаются в длительном и дорогостоящем лечении с последующей реабилитацией, которые, однако, не могут полностью предупредить развитие тяжелых отдаленных последствий социальной, физической и психической дезадаптации [1].

Выраженность ответных метаболических реакций ткани мозга на ишемию зависит от степени снижения мозгового кровообращения.

В зоне первого критического уровня (снижение уровня кровотока до 55 мл на 100 г в мин.) происходит торможение белкового синтеза, второго (снижение до 35 мл на 100 г в мин.) — активация анаэробного гликолиза. Снижение кровотока до 20 мл на 100 г в мин. (третий критический уровень) сопровождается формированием на фоне нарастающей ишемии митохондриальной дисфункции и энергетического дефицита, развитием глутамат-кальциевого каскада и дестабилизацией клеточных мембран. Области мозга со снижением кровотока менее 10 мл на 100 г в мин. в течение 6-8 мин. с момента острой ишемии становятся необратимо поврежденными и составляют «ядро» инфаркта. Оно окружено зоной «ишемической полутени», или пенумбры (третий критический уровень), за счет которой область некроза увеличивается первые 3-6 ч с окончательным формированием через 48-72 ч и более в зависимости от сохраняющегося отека мозга [1, 2]. Это связано с агрессивным воздействием активизированных ишемией клеток глии на жизнеспособные нейроны пенумбры путем вторичного повреждения мозга. Поэтому актуальным остается поиск новых средств не только лечения, но и профилактики постинсультных проблем.

Среди механизмов вторичного повреждения ткани мозга особое значение имеют реакции локального воспаления вокруг зоны «ядра» инфаркта, а именно резкий подъем уровней провоспалительных медиаторов — цитокинов, которые определяют степень выраженности воспалительной реакции, условия для немедленной или отсроченной гибели клеток вокруг первичного некроза и размеры окончательного постишемического дефекта мозга [3, 4]. К провоспалительным цитокинам относятся интерлейкины (IL-1,

IL-6, IL-8) и фактор некроза опухолей (TNF- α). В семейство IL-1 объединяют IL-1 α , IL-1 β и рецепторный антагонист IL-1 (IL-1Ra). Уже через несколько минут после ишемии начинается экспрессия генов IL-1 и секреция биологически активного IL-1 в окружающую среду. Основной секретируемой формой IL-1 является IL-1 β [5]. Биологическое действие IL-1 реализуется после связывания со специфическими мембранными рецепторами трех типов. При взаимодействии IL-1 β с IL-1RI сигнал передается внутрь клетки, активируются ядерные факторы транскрипции AP-1 и NF- κ B, что изменяет поведение клетки-мишени и приводит к развитию острофазового клеточного ответа [5, 6].

При острой церебральной ишемии массивное внутриклеточное поступление ионов натрия и кальция стимулирует активацию фосфолипаз и протеиназ, в результате чего образуются простагландины и цитокины (в первую очередь IL-1 и TNF- α), повреждающие цитоскелет и вызывающие клеточную гибель. С другой стороны, внеклеточное высвобождение провоспалительных IL-1, TNF- α и высокоактивных свободных радикалов оказывает негативное воздействие на межклеточные структуры и сосудистую стенку, что способствует формированию цитотоксического отека глиии и нейронов, проникновению токсических веществ в мозговую ткань, гибели жизненно важных нейронов с окончательным формированием инфарктного очага. Доказано, что введение в желудочки мозга крыс рекомбинантного человеческого IL-1 после обратимой часовой окклюзии средних мозговых артерий дозозависимо увеличивало отек мозга, размер «ядра» инфаркта, количество нейтрофилов в зоне ишемии [2, 6, 7].

Целью исследования является изучение показателей антиоксидантной системы мозга крыс с экспериментальной церебральной ишемией на фоне фармакологической коррекции рецепторным антагонистом IL-1 (АРИЛ). Он обладает высоким аффинитетом к рецепторам IL-1, при взаимодействии с которыми не проявляет биологической активности IL-1 [5, 8]. Препаратом сравнения избран тиотриазолин — известный церебропротектор метаболитного действия [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на белых нелинейных крысах массой 160-200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария при естественной смене дня и ночи. Острое нарушение

мозгового кровообращения (ОНМК) вызвали необратимой двусторонней перевязкой общих сонных артерий под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг). Животные были разделены на четыре группы по 10 крыс. 1 группа — интактные животные, 2 группа — контрольная патология (животные с ОНМК), 3 группа — с ОНМК, которым вводили тиотриазолин (50 мг/кг), 4 группа — с ОНМК с введением АРИЛ (7,5 мг/кг — предварительно определенная доза ED₅₀ по церебропротекторной активности). Препараты вводили сразу после выхода животных из наркоза (тиотриазолин — внутривентрикулярно, АРИЛ — внутримышечно), в дальнейшем 1 раз в сут. в течение острого периода ишемии (4 дня) и фазы восстановления (18 дней). По истечении указанных сроков животных выводили из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации. В гомогенате мозга биохимическими методами определяли содержание продуктов окислительной модификации белка по уровню альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов и перекисного окисления липидов по содержанию диеновых конъюгатов (ДК), триенкетонов (ТК) и малонового диальдегида (МДА). Антиоксидантную защиту оценивали по активности в ткани мозга супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПР). Активность NO-синтазы определяли по скорости убывания количества НАДФН⁺, содержание нитритов — по реакции Грисса. Полученные данные были проанализированы вариационно-статистическим методом с использованием критерия Стьюдента (t). Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% (p<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение мозгового кровотока при ишемическом повреждении ограничивает доступ к глиальным клеткам и нейронам кислорода и глюкозы, что нарушает процессы окислительного фосфорилирования, состояние митохондриальных ферментных комплексов и приводит к ряду регуляторных функционально-метаболических изменений. Важным процессом адаптации к гипоксии является метаболизм оксида азота (NO), который в обычных условиях образуется путем окисления терминальной гуанидиновой группы L-аргинина при участии NO-синтазы. В физиологических концентрациях NO выполняет регуляторные функции, активируя растворимую гуанилатциклазу и вызывая тем самым повышение в клетках уровня

цГМФ. Высокие концентрации NO токсичны для клеток, ферментов, ионных каналов и генетического аппарата. Избыток NO нитрозилирует белки-ферменты дыхательной цепи митохондрий и цикла Кребса, ингибирует их, что ведет к истощению запасов НАД и АТФ и гибели нейронов по пути некроза или апоптоза [9].

При гипоксии мозга на фоне перевозбужденных глутаматных NMDA-рецепторов активация Ca^{2+} -зависимой кальмодулинкиназы активирует нейрональную NOS и в течение нескольких секунд синтез оксида азота резко повышается. Кроме того, продуцируемые в ответ на гипоксию провоспалительные цитокины экспрессируют в глиальных клетках индуцибельную NOS, что ведет к гиперпродукции NO и токсическим эффектам его избыточных количеств.

Церебральная ишемия крыс после перевязки общих сонных артерий сопровождалась к 4 сут. эксперимента резким повышением уровня стабильного метаболита NO — NO_2^- (в 3,7 раза) и активности NO-синтазы (почти в 2 раза) с последующим снижением к 18 сут. Введение тиотриазолина и АРИЛ животным с ОНМК привело к достоверному уменьшению уровня нитратов и активности NO-синтазы в ткани головного мозга, при этом более выраженный эффект к 4 сут. отмечен у тиотриазолина, к 18 сут. — у АРИЛ.

Снижение поступления молекулярного кислорода в нейроны стимулирует образование активных форм кислорода (АФК), которые инициируют процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, прямой деструкции нуклеиновых кислот и окислительной модификации белка (ОМБ). В цепи реакций окисления липидов образуются неустойчивые гидроперекиси, их распад сопровождается образованием вторичных и конечных продуктов ПОЛ (ТК, ДК, МДА), которые повреждают мембраны и клеточные структуры [9]. Повышение уровней АФК стимулирует синтез транскрипционного фактора, индуцируемого при гипоксии (HIF), активацию HIF-1-зависимых генов и синтез провоспалительных цитокинов [10].

Церебральная ишемия сопровождалась повышенным в 2-3 раза содержанием продуктов ПОЛ и ОМБ в коре мозга животных с ОНМК на 4 сут. эксперимента. Увеличение продуктов свободнорадикальных реакций происходило на фоне угнетения активности антиоксидантных ферментов СОД, каталазы и ГПР. Применение тиотриазолина приводило к выраженному достоверному снижению продуктов ОМБ и ПОЛ и повышению показателей антиоксидантной защиты к 4 сут. с сохранением этой динамики

в периоде восстановления. Показатели ОМБ в группе АРИЛ к 18 сут. были ниже, чем в группе тиотриазолина, и лишь на 36-38% выше интактной группы. Показатели ПОЛ в группе АРИЛ к 18 сут. почти приблизились к таковым в интактной группе, были достоверно ниже группы КП и тиотриазолина (ТК, ДК). Аналогично, на фоне введения АРИЛ изменились показатели активности СОД, каталазы и ГПР — увеличились на 4 сут. почти до уровней группы тиотриазолина и превысили их на 18 сут.

При острой гипоксии отмечают волнообразную динамику изменения уровней АФК с периодической сменой активации и подавления процессов ПОЛ [10]. Выраженность и мобильность постшемического ответа имеет резкие тканеспецифические различия и отражает потребность поддержания в клетке сбалансированного соотношения про- и антиоксидантных факторов.

ВЫВОДЫ

Активность про- и антиоксидантных показателей в ткани мозга после моделирования ОНМК в фазе острого воспалительного ответа и восстановительного периода изменялись в разной степени. Введение АРИЛ оптимизировало баланс про- и противовоспалительных цитокинов в остром и отдаленном периодах наблюдения и существенно улучшило состояние животных с ОНМК, особенно в период выздоровления. Требуется дальнейшее изучение церебропротекторных свойств АРИЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.
2. Скворцова В.И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии // Инсульт. — 2003. — №9. — С. 20-22.
3. Blum A., Miller H. Role of cytokines in heart failure // Am. Heart. J. — 1998. — Vol. 135. — P. 181-186.
4. Ferrarese C., Mscarucci P., Zoai C. et al. Increase cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1999. — Vol. 19. — №9. — P. 1004-1009.
5. Симбирцев А.С. Цитокины: Классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т.3. — №2. — С. 16-22.
6. Fridlander R.M., Gardiardi V., Rotello R.J., Yuan H. Functional role of interleukin-1 β in IL-1 β converting enzyme-mediated apoptosis // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 184. — P. 717-724.
7. Buttint M., Sauter A., Boddeke H.W. Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischemia

- in the rat // *Mol. Brain Res.* — 1994. — Vol. 23. — №1-2. — P. 126-134.
8. Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2002. — Vol. 13. — №4-5. — P. 323-340.
9. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Левицкий Е.Л. и соавт. Влияние тиотриазолина, глицина, магния и их комбинации на ответ генома и показатели антиоксидантной системы в коре головного мозга крыс с церебральной ишемией // *Современные проблемы токсикологии.* — 2007. — №3. — С. 61-65.
10. Сазонтова Т.Г., Жукова А.Г., Анчишина Н.А. и соавт. Факторы транскрипции HIF-1 α , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии // *Вестник РАМН.* — 2007. — №2. — С. 17-25.

Е.В.Супрун, І.Ф.Беленічев, О.М.Іщенко.
Вплив антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на вільнорадикальне ушкодження в умовах білатеральної оклюзії загальних сонних артерій у щурів. Харків, Запоріжжя, Україна, Санкт-Петербург, Росія.

Ключові слова: ІЛ-1, рецепторний антагоніст ІЛ-1, експериментальна церебральна ішемія.

На моделі незворотної білатеральної оклюзії загальних сонних артерій у щурів у гомогенаті мозку вивчена динаміка показників циклу азоту,

перекисного окислення ліпідів, окислювальної модифікації білків та антиоксидантного захисту на фоні корекції тиотриазоліном (50 мг/кг) та антагоністом рецептора ІЛ-1 (7,5 мг/кг). Церебропротекторна активність препаратів на 4 і 18 добу експерименту мала відмінності, в період відновлення більш ефективним був рецепторний антагоніст ІЛ-1.

E.V.Suprun, I.F.Belenichev, A.M.Ischenko.
The influence of the receptor antagonists of IL-1 on free radical injury in conditions of bilateral occlusion of carotid artery in rats. Kharkiv, Zaporizhzhya, Ukraine, St. Petersburg, Russia.

Key words: IL-1, receptor antagonist of IL-1, experimental cerebral ischemia.

On the model of irreversible bilateral occlusion of carotid artery in rats in homogenate of brain the dynamics of index of nitrogen cycle, lipid peroxidation, oxidizing modification of protein and antioxidant protection was studied on the background of correction with thiotriazolin (50 mg/kg) and the receptor antagonist of IL-1 (7,5 mg/kg). Cerebroprotective activity of preparations on 4 and 18 day of experiment had differences; in period of rehabilitation receptor antagonist of IL-1 was more efficient.

Надійшла до редакції 30.10.2010 р.