

Э. В. Супрун¹, Л. А. Громов², И. Ф. Беленичев³

¹ Национальный фармацевтический университет (г. Харьков);

² Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины (г. Киев);

³ Запорожский медицинский университет (г. Запорожье)

КОРРЕКЦИЯ АНТАГОНИСТОМ РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

На модели необратимой билатеральной окклюзии общих сонных артерий изучен психофизиологический статус крыс на фоне коррекции антагонистом рецепторов интерлейкина-1 — АРИЛ-1 (7,5 мг/кг) в сравнении с пираретамом (200 мг/кг) и тиотриазолином (50 мг/кг). Отмечено снижение выраженности постинсультных неврологических и когнитивных нарушений — улучшение показателей двигательной активности, психоневрологического статуса по шкале McGrow и воспроизведения рефлекса пассивного избегания, наиболее эффективным был АРИЛ-1.

Ключевые слова: ИЛ-1, антагонист рецепторов ИЛ-1, ишемический инсульт, цереброреперфузия.

Последние годы продолжается рост распространенности ишемических повреждений головного мозга среди населения промышленно развитых стран. 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 [5].

Доказано, что в первые часы после ишемического инсульта степень выраженности структурно-функциональных изменений нейронов в пострадавшей области мозга уменьшается от центра некроза к периферическим зонам пенумбры. Особенности распространения нейродегенеративных изменений внутри области пенумбры определяют окончательное формирование размеров инфаркта мозга к 3—5-м суткам заболевания, что предопределяет возможность разработки эффективных методов вторичной нейропротективной терапии [3, 4].

При нетяжелой или кратковременной фокальной ишемии после первичного поражения отдельных сверхчувствительных к ишемии нейронов развивается вторичное повреждение как результат агрессивного воздействия на нейроны периинфарктной зоны активированных ишемией клеток глии. Именно возбужденная ишемией микроглия индуцирует реакции локального воспаления в области ишемического очага, которые занимают важное место среди механизмов вторичного поражения ткани мозга [6]. При этом даже незначительное увеличение концентрации провоспалительных факторов способствует прогрессированию атерогенеза и развитию хронической ишемизации мозга с образованием обширных некротических очагов. При ишемическом инсульте происходит значительное повышение уровней провоспалительных факторов, что не только создает условия для острой гибели клеток первичного очага и отсроченной — перифокальной зоны, но и определяет динамику дальнейшего прогрессирования постишемических изменений [7, 14].

Известно, что в ЦНС микроглия является единственным представителем иммунокомпетентных клеток, способных защитить мозг от повреждающих факторов. В норме эти клетки находятся в состоянии относительного

покоя, по мере необходимости активируются, продуцируют провоспалительные медиаторы и быстро возвращаются в состояние покоя. При ишемии клетки микроглии теряют способность возвращаться к функциональному покою, активно поддерживают воспалительные реакции и замыкают порочный круг формирования мозговой недостаточности и отдаленных нейрональных потерь. Экспериментально доказано, что активированная обратимой ишемией микроглия начинает секрецию потенциально нейротоксичных медиаторов (провоспалительные цитокины, нитроксид, протеазы, лиганды для глутаматного NMDA-рецепторного комплекса, лизоцимы, эйкозаноиды, супероксидный анион и других), а также инициирует цитотоксическое действие астроцитов [5, 7]. Так, при экспериментальной ишемии микроглия может поражать область пенумбры за 20 минут реперфузии, что подтверждает значимость ее реакций в отсроченной гибели нейронов. Однако одновременно с нейротоксичными веществами микроглиальные клетки индуцируют синтез факторов, способствующих выживанию нейронов и оптимизации постишемического рубцевания [12]. К веществам, обеспечивающим в очаге ишемии как повреждающее действие, так и систему жизнеспособности клеток, относятся цитокины, нейротрофические факторы и модуляторные нейропептиды. Цитокины — многофункциональные растворимые полипептидные медиаторы, которые подразделяют на провоспалительные (интерлейкины — IL-1, IL-6, IL-8, фактор некроза опухолей — ФНО и др.) и регуляторные (факторы роста, IL-10, IL-4). Связываясь со специфическими рецепторами, цитокины активируют вторичные внутриклеточные мессенджеры и далее протеинкиназы и фосфатазы [11, 18].

В семейство интерлейкина-1 объединяют IL-1 α , IL-1 β и рецепторный антагонист IL-1 (IL-1Ra). Цитокины IL-1 α и IL-1 β кодируются различными генами, локализованными в хромосоме 2, но имеют гомологию в аминокислотной последовательности в 26 %, на уровне ДНК — на 45 %, обладают практически одинаковым спектром активности и конкурентно связываются с одними и теми же специфическими рецепторами [15]. Третий белок с подобной структурой — IL-1Ra имеет ту же гомологию с IL-1 α и IL-1 β , способен специфически связываться с рецепторами IL-1 без проявления биологической активности [14].

Белки семейства IL-1 являются индуцибельными, синтезируются в ответ на ишемию/гипоксию клеток мозга и обеспечивают развитие и активность воспалительной и других защитных реакций, т. е. острофазового ответа. Уже через несколько минут после начала ишемии начинается экспрессия генов IL-1, происходят взаимосвязанные последовательные этапы появления мРНК, внутриклеточного белка и секреция биологически активного IL-1 в окружающую среду. IL-1 α синтезируется сразу в активной форме, функционирует в основном в виде мембранной формы и внутриклеточного регулятора с продолжительностью жизни 15 часов. Основной секретруемой формой IL-1 является IL-1 β (активен 2,5 часа),

предшественник которого превращается в зрелую биологически активную форму под влиянием высоко-специфической цистеиновой протеазы — каспазы-1 или IL-1 бета-конвертазы (ICE) [8].

В формировании постшемической воспалительной реакции сочетано с IL-1 участвуют также провоспалительные цитокины FNO α и IL-6. Многие функции IL-1 идентичны таковым у FNO α и FNO β , во многих исследованиях доказаны не только практически неразделимость их действия на различные клетки в условиях *in vitro* и *in vivo*, но и потенцирование их действия [11, 16].

Таким образом, цитокины IL-1 α и IL-1 β , FNO α являются ключевыми медиаторами микроглиальных нейроиммунных функций и вырабатываются локально в ответ на ишемизацию головного мозга. После перенесенного инсульта уровни этих цитокинов остаются достоверно повышенными в течение нескольких дней, что подтверждает интенсивность реакций локального воспаления и их роль в процессе повреждения ткани мозга [7, 11].

По сравнению с прочими элементами мозга, страдающими от ишемического воздействия, особую ранимость обнаруживают нейроны гиппокампа [17]. Результаты многих экспериментальных и клинических исследований показали участие гиппокампа в реализации процессов приобретения и консолидации следов памяти, реагировании на новизну обстановочных стимулов и организации ориентировочного рефлекса, т. е. в механизмах памяти и обучения и обеспечении познавательной деятельности человека и животных [9]. В экспериментальных и клинических условиях показано, что фокальная или глобальная ишемия неизменно сопровождаются поражениями гиппокампа и ведут к когнитивной патологии [1, 2, 6]. Экспериментально доказано, что в условиях глобальной или фокальной ишемии степень повышения продукции IL-1 β коррелирует со степенью окончательных нейрональных потерь. Однако прогрессирование повреждения пenumбры происходит не только под влиянием абсолютного повышения уровней провоспалительных факторов, но и вследствие недостатка нейротрофических и противовоспалительных агентов [12].

Следовательно, перспективным направлением вторичной церебропротективной терапии является коррекция дефицита противовоспалительных веществ, в том числе с использованием антагониста рецепторов IL-1 (АРИЛ). В предшествующих работах нами была изучена его антигипоксическая активность [6]. Целью данного исследования явилось изучение влияния АРИЛ на психофизиологический статус крыс в условиях экспериментального ишемического инсульта. Препаратами сравнения избраны классические церебропротекторы — пирарцетам и тиотриазолин.

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». Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) вызывали необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий — под этаминал-натриевым наркозом (40 мг/кг). Посредством хирургического доступа выделяли общие сонные артерии, подводили под них шелковые лигатуры и перевязывали.

Были поставлены 2 серии опытов. В первой серии (I с) животные были разделены на 6 групп по 10 крыс. Первая

группа — ложноперированные животные (ЛО), 2-я — животные с ОНМК (контрольная патология — группа К), 3-я — животные с патологией, которым вводили пирарцетам в дозе 200 мг/кг (группа П). Крысам с ОНМК 4, 5 и 6 групп вводили АРИЛ в дозах 5—10—15 мг/кг (группы А5, А10, А15). Препараты вводили внутримышечно два раза в сутки на протяжении 3 дней, последний раз за 1 час до операции.

Во второй серии (II с) животные были разделены на 4 группы по 10 крыс. Первая и вторая группы аналогично первой серии, третья — животные с патологией, которым вводили тиотриазолин в дозе 50 мг/кг (группа Т), четвертая — патология с введением АРИЛ (группа А7,5) в дозе 7,5 мг/кг (ЕД₅₀ по церебропротекторной активности). Препараты вводили сразу после выхода животных из наркоза (тиотриазолин — внутривенно, АРИЛ — внутримышечно), в дальнейшем 1 раз в сутки в течение 18 дней. Оценивали выживаемость крыс и массу мозга (I с), динамику развития постшемических нарушений и эффекты АРИЛ (I и II с). Поведенческие эксперименты проводили в первой половине дня. Ориентировочно-исследовательское поведение крыс оценивали в условиях методики открытого поля. Показатели поведения (горизонтальные и вертикальные перемещения, обследование отверстий) регистрировали в течение 3 минут. Неврологический дефицит у животных второй серии оценивали по шкале Stroke-index McGrow в течение острого периода ишемии и фазы восстановления — на 4 и 18 сутки. Тяжесть состояния определяли по сумме соответствующих баллов. Обучение условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ) проводили по стандартной методике после завершения наблюдения в восстановительном периоде нарушений мозгового кровообращения на 18 сутки.

Полученные результаты проанализированы с использованием критериев *t*-Стьюдента, *U*-параметра Манна — Уитни и критерия χ^2 . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95 % ($p < 0,05$).

В ходе первого эксперимента в течение 7 суток после операции в группе ЛО гибели животных не наблюдали. В группе контрольной патологии случаи гибели крыс отмечались до 4 суток включительно (рис. 1), показатель выживаемости уменьшился с 50 % в первые сутки до 30 % на 5—7 сутки. Во всех группах крыс, получавших АРИЛ, гибель животных отмечена только на протяжении первых суток, летальность снизилась в зависимости от дозы с 60 % (5 мг/кг) до 24 % (15 мг/кг).

При острой церебральной ишемии происходят последовательные процессы микроциркуляторно-клеточного каскада — снижение мозгового кровотока приводит к максимуму энергетического дефицита, развивается глутаматная «эксайтотоксичность», массивное внутриклеточное поступление ионов натрия и кальция стимулирует активацию фосфолипаз и протеиназ, в результате чего образуются цитокины (в первую очередь IL-1 и FNO α), простагландины, лейкотриены, повреждающие цитоскелет и вызывающие клеточную гибель [5, 6]. С другой стороны, внеклеточное высвобождение провоспалительных IL-1 и FNO α , медиаторов воспаления, высокоактивных свободных радикалов и острофазовых астроцитарных белков оказывает негативное воздействие на межклеточные структуры, окружающие клеточные мембраны и сосудистую стенку. При этом происходит повреждение базальной сосудистой мембраны, межэндотелиальных контактов и самой эндотелиальной выстилки церебральных сосудов [4].

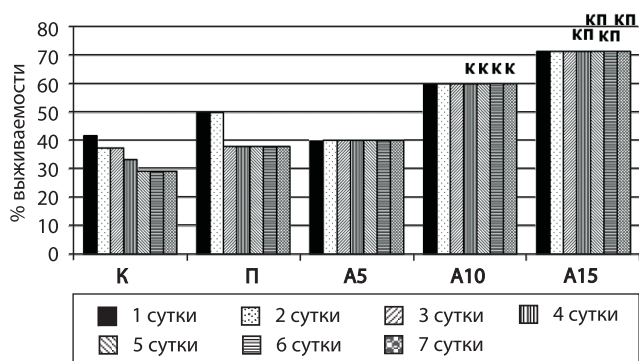


Рис. 1. Влияние АРИЛ и пирацетама на выживаемость крыс с ОНМК

Примечания. Здесь и далее: К — группа контрольной патологии; П — группа пирацетама; Т — группа тиотриазолина; А5; А7,5; А10; А15 — группы АРИЛ в дозах 5; 7,5; 10; 15 мг/кг.

* — отклонения достоверны относительно интактных животных ($p < 0,05$);

К — отклонения достоверны относительно К ($p < 0,05$);

П — отклонения достоверны относительно П ($p < 0,05$);

Т — отклонения достоверны относительно Т ($p < 0,05$).

Эндотелий претерпевает ряд существенных изменений: структурные повреждения (разрыв, сморщивание и коагуляционный некроз), функциональная перестройка (выработка молекул адгезии, ФНО α , фактора активации тромбоцитов, тромбоксана, вазоконстрикторов и др.), приобретение гемостатических прокоагуляционных свойств, увеличение проницаемости его базальной мембраны и трансэндотелиальных контактов для нейтрофилов и жидкости на фоне угнетения абсорбции [10]. Это способствует формированию цитотоксического отека глии и нейронов (в течение 6—72 часов после развития ишемии), проникновению токсических веществ из сосудистого русла в мозговую ткань на фоне продолжающихся оксидантных и прокоагуляционных реакций, что приводит к гибели жизненно важных нейронов с формированием инфарктного очага [3].

У животных группы К показатель массового коэффициента мозга (рис. 2) увеличился на 18 %, что отражает выраженность отека и степень тяжести состояния при церебральной ишемии. АРИЛ блокирует проявления локального воспаления при ОНМК и ингибирует экстравазацию жидкости, что подтверждается достоверным снижением массы мозга по сравнению с группами К и П.

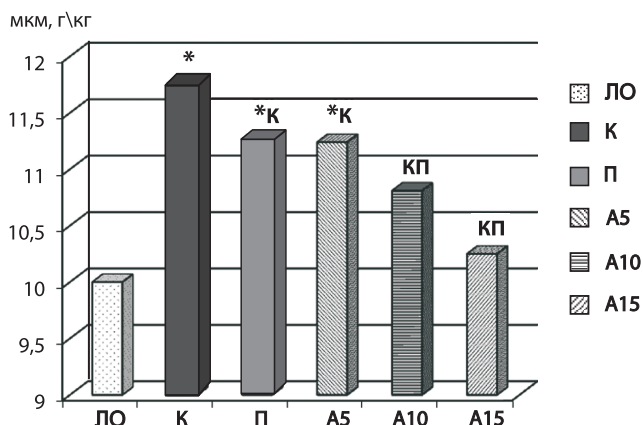


Рис. 2. Влияние АРИЛ и пирацетама на массовый коэффициент мозга у крыс с ОНМК

Исследование неврологического статуса крыс по шкале McGrow показало, что у крыс группы ЛО не наблюдали тяжелых неврологических нарушений в виде манежных движений, парезов и параличей. У большинства животных группы К в остром периоде ОНМК (рис. 3) наблюдались как умеренно выраженные неврологические нарушения (вялость, замедленность движений, слабость конечностей, птоз в 60 % случаев), так и тяжелые — манежные движения (80 %), парезы и параличи конечностей (90 %).

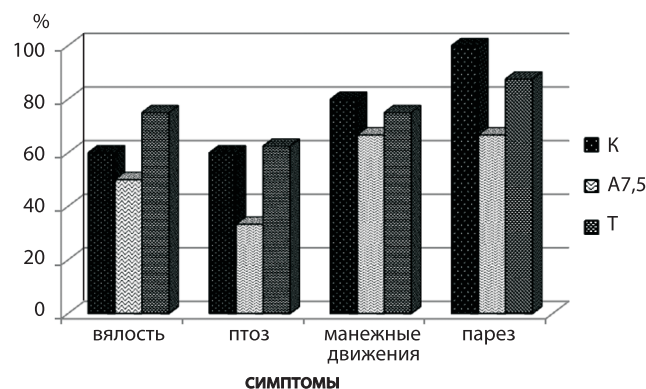


Рис. 3. Влияние АРИЛ и тиотриазолина на неврологический дефицит на 4 сутки после ОНМК (шкала McGrow)

В восстановительном периоде после ОНМК (рис. 4) у животных группы К выраженность неврологических дефицитов изменилась незначительно. АРИЛ ослаблял проявления указанных неврологических нарушений на протяжении всего эксперимента, существенно снизилась частота проявлений парезов и параличей конечностей, манежных движений, эффекты более выражены в периоде восстановления.

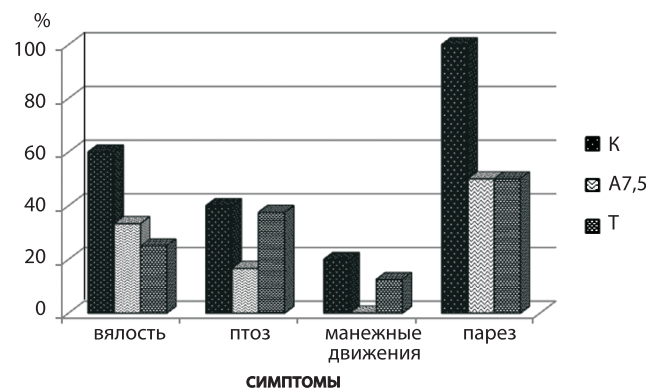


Рис. 4. Влияние АРИЛ и тиотриазолина на неврологический дефицит на 18 сутки после ОНМК (шкала McGrow)

Изучение ориентировочно-исследовательского поведения в открытом поле показало, что у крыс группы К отмечено значительное, статистически достоверное уменьшение всех показателей (количество вертикальных и горизонтальных передвижений, число обследованных отверстий) в остром (рис. 5) и восстановительном (рис. 6) периодах после инсульта.

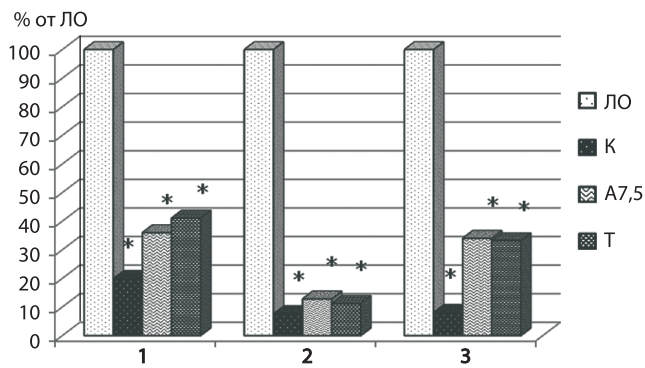


Рис. 5. Поведенческие реакции крыс с ОНМК на 4 сутки наблюдения

Здесь и на рис. 6: 1 — количество горизонтальных движений, 2 — вертикальная двигательная активность, 3 — обследование отверстий

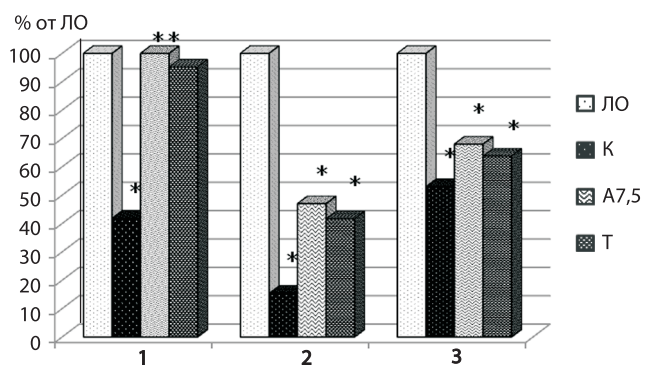


Рис. 6. Поведенческие реакции крыс с ОНМК на 18 сутки наблюдения

В группе животных, получавших АРИЛ, наблюдалась тенденция к восстановлению ориентировочно-исследовательского поведения, особенно по показателю горизонтальных перемещений, который в восстановительном периоде после ишемии практически достиг начального уровня. В целом, при сравнении суммарных показателей, АРИЛ в значительной степени восстановил ориентировочно-исследовательское поведение постинсультных крыс в открытом поле на 81 %.

При изучении влияния ОНМК на память животных (рис. 7) установлено, что в группе ЛО 90 % животных через сутки после обучения помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда, в группе К в темную камеру зашли все животные. На фоне применения АРИЛ отмечалось статистически достоверное увеличение латентного времени рефлекса по сравнению с животными с ОНМК.

Полученные экспериментальные данные во многом совпадают с клиническими наблюдениями. Различные формы ишемизации мозга, наряду с когнитивными расстройствами, ведут к развитию дегенеративных процессов в гиппокампе. Данные оценки мозга в постинсультный период методами компьютерной резонансной и магнитно-резонансной томографии, а также микроскопического изучения посмертных образцов мозговой ткани подтверждают, что ишемии сопутствуют уменьшение размеров и полиморфные дистрофические процессы в гиппокампе и в коре лобной и височных долей большого полушария [1].

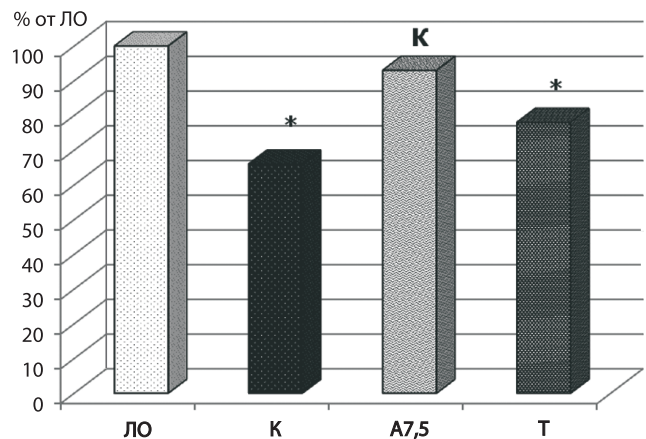


Рис. 7. Влияние АРИЛ и тиотриазолина на воспроизведение УРПИ у крыс с ОНМК после обучения на 18 сутки

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что в сравнении с ложнооперированными животными в группе крыс с ОНМК увеличивается показатель летальности, проявления отека мозга, выраженного неврологического дефицита и ослабления памяти.

АРИЛ при профилактическом и лечебном режиме введения предупреждает гибель животных с ОНМК и снижает выраженность отека головного мозга. АРИЛ значительно снижает выраженность постинсультных неврологических и когнитивных нарушений — улучшает показатели двигательной активности, психоневрологического статуса по шкале McGrow и воспроизведение рефлекса пассивного избегания, эффекты более выражены в восстановительном периоде.

Полученные в настоящей работе данные подтверждают наличие у АРИЛ нейропротекторных свойств. Они определяют его способность при ишемическом повреждении мозга как блокировать избыточные количества провоспалительного ИЛ-1 и его эффекты, так и активировать противовоспалительное звено цитокинового каскада, что снижает выраженность локального воспаления и постинсультные нейрональные потери.

Список литературы

1. Арушанян, Э. Б. Гиппокамп и нарушения познавательной деятельности / Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер // Журнал неврологии и психиатрии. — 2007. — № 7. — С. 72—77.
2. Беридзе, М. З. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте / Беридзе М. З., Урушадзе И. Т., Шакаришвили Р. Р. // Инсульт. — 2001. — № 3. — С. 35—40.
3. Виленский, Б. С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение / Б. С. Виленский. — СПб.: Фолиант, 2002. — 397 с.
4. Винничук, С. М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения / С. М. Винничук, Т. М. Черненко. — Киев: Комполис, 2003. — 120 с.
5. Гусев, Е. И. Глутаматная нейротрансмиссия и метаболизм кальция в норме и при ишемии головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова // Успехи физиолог. наук. — 2002. — № 33. — С. 80—93.
6. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии / [Гусев Е. И., Скворцова В. И., Журавлева Е. Ю. и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. — 1999. — № 5. — С. 55—61.
7. Жданов, Г. Н. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови

больных в остром периоде ишемического инсульта / Г. Н. Жданов, М. М. Герасимова // Цитокины и воспаление. — 2006. — Т. 5, № 1. — С. 27—30.

8. Влияние моноклональных антител против интерлейкина-1 альфа на цитостатические свойства нейтрофилов периферической крови человека / [Кулаков В. В., Симбирцев А. С., Котов А. Ю. и др.] // Иммунология. — 1998. — № 4. — С. 39—40.

9. Лурия, А. Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга / А. Р. Лурия. — М.: Медицина, 2000. — 287 с.

10. Петрищев, Н. Е. Функциональное состояние эндотелия при ишемии-реперфузии (Обзор литературы) / Н. Е. Петрищев, Т. Д. Власов // Рос. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. — 2000. — Т. 86, № 2. — С. 148—163.

11. Симбирцев, А. С. Цитокины: Классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 2. — С. 16—22.

12. Скворцова, В. И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии / В. И. Скворцова // Инсульт. — 2003. — № 9. — С. 20—22.

13. Супрун, Е. В. Дослідження антигіпоксичної дії антагоністу рецепторів інтерлейкіну-1 / Е. В. Супрун // Експериментальна та клінічна медицина. — 2008. — № 2. — С. 56—58.

14. Arend, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease / W. P. Arend // Cytokine Growth Factor Rev. — 2002. — Vol. 13, № 4—5. — P. 323—340.

15. Comparison of two polymorphism of IL-1 gene family: IL-1 receptor antagonist polymorphism contributes to subseptibility to severe sepsis / [Fang X., Schroder C., Hoeft A., Stuber F.] // Crit. Care Med. — 1999. — Vol. 27. — P. 1330—1334.

16. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum / [Kumar A., Thota V., Dee L., et al.] // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 183. — P. 949—958.

17. Pulsinelli, W. A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics / W. A. Pulsinelli: Progr Brain Res 1985; 53: 29—37.

18. Vanderheyden, M. Proinflammatory cytokines and endothelium-dependent vasodilatation in the forearm / Vanderheyden M., Kersschot E., Paulus W. J. // Eur. Heart. J. — 1998. — P. 747—752.

Надійшла до редакції 29.04.2010 р.

Е. В. Супрун¹, Л. О. Громов², І. Ф. Беленічев³

¹ Національний фармацевтичний університет (м. Харків);

² Інститут фармакології та токсикології АМН України (м. Київ);

³ Запорізький медичний університет (м. Запоріжжя)

Корекція антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 неврологічних та когнітивних порушень при експериментальному ішемічному інсульті

На моделі незворотної білатеральної оклюзії загальних сонних артерій проведено вивчення психофізіологічного статусу щурів на фоні корекції антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 — АРІЛ-1 (7,5 мг/кг) в порівнянні з пірацетамом (200 мг/кг) та тіотриазоліном (50 мг/кг). Відзначено зниження вираженості постінсультних неврологічних та когнітивних порушень — покращання показників рухової активності, психо-неврологічного статусу за шкалою McGrow та відтворення рефлексу пасивного запобігання, більш ефективним був АРІЛ-1.

Ключові слова: ІЛ-1, АРІЛ-1, ішемічний інсульт, нейропротекція.

Е. В. Супрун¹, Л. А. Громов², І. Ф. Беленічев³

¹ National University of Pharmacy (Kharkiv);

² Institute of Pharmacology and Toxicology, of the AMS of Ukraine (Kyiv);

³ Medical Institute of Zaporizhzhya (Zaporizhzhya)

Correction receptor antagonist for interleukin-1 of neurological and cognitive disorders in experimental ischemic stroke

On the model of irreversible bilateral occlusion of carotid artery was studied the psychophysiological status in rats on the background correction of receptor antagonist for interleukin-1 — ARIL (7.5 mg / kg) compared with piracetam (200 mg/kg) and tiotriazolin (50 mg/kg). Marked decrease of intensity of afterischemic neurological and cognitive disorders — improvement of the data of movement activity, psychophysiological status on the McGrow's scale and the reproduction of the reflex of passive avoidance, more effective was ARIL-1.

Keywords: IL-1, ARIL, ischemic stroke, neuroprotection.