

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИТОКИНОВОЙ ЦЕРЕБРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

На модели экспериментального геморрагического инсульта у крыс (путем введения аутокрови во внутреннюю капсулу головного мозга) на фоне коррекции рецепторным антагонистом интерлейкина-1 (7,5 мг/кг) отмечено повышение процента выживших животных, стабилизация функционального состояния митохондрий (по открытию митохондриальной поры), показателей энергетического обмена (АТФ, АДФ, АМФ), предупреждение развития процессов окислительной модификации белка (АФГ и КФГ) и стабилизация экспрессии генов раннего реагирования (с-Fos и Bcl-2) в нейронах коры головного мозга.

Ключевые слова: ИЛ-1, рецепторный антагонист ИЛ-1, геморрагический инсульт, цитокиновая церебропротекция

В последние десятилетия отмечен рост показателей распространенности и тяжести геморрагических инсультов (ГИ), которые являются наиболее тяжелой формой острого нарушения мозгового кровообращения. При ГИ происходят типичные нарушения микроциркуляции с последующим ишемическим повреждением ткани мозга. Развивается энергетический дефицит, формирование глутамат-кальциевого каскада, проявление лактат-ацидоза и отека мозга, активация свободнорадикального окисления, активация некроза/апоптоза [1, 2].

Выраженность патологических изменений при ГИ определяется как объемом и локализацией гематомы, так и выраженностью аутоиммунных процессов [3]. Доказано, что в первые часы после острого нарушения мозгового кровообращения степень выраженности структурно-функциональных изменений нейронов в пострадавшей области мозга уменьшается от центра к периферическим зонам пенумбры. Вокруг геморрагического ядра активируется микроглия и индуцирует реакции локального ишемического повреждения, которые определяют механизмы вторичного поражения ткани мозга [4, 5].

В ответ на ишемизацию головного мозга локально вырабатываются ИЛ-1 β и FNO α , которые являются ключевыми медиаторами микроглиальных нейроиммунных функций. Уровни этих провоспалительных цитокинов остаются повышенными в течение нескольких дней после развития инсульта, что свидетельствует об интенсивности воспалительных реакций и их роли в процессах повреждения мозга [6, 7]. Даже незначительное увеличение концентрации провоспалительных факторов способствует ухудшению клинического состояния пациентов, хронизации процесса, повышает вероятность тяжелых постинсультных осложнений и инвалидизации. При геморрагическом инсульте происходит значительное повышение уровней провоспалительных факторов, что определяет динамику дальнейшего прогрессирования постишемических изменений. Особенности распространения таких нейродегенеративных изменений влияют на окончательное формирование размеров инфаркта мозга к 3—5-м

суткам заболевания и тем самым определяют возможность применения эффективных методов вторичной нейропротективной терапии [8].

Перспективным направлением вторичной церебропротективной терапии является коррекция цитокинового дисбаланса, в том числе с использованием рецепторного антагониста ИЛ-1. В предшествующих работах нами была изучена его антигипоксическая активность [9]. Целью данного исследования явилось изучение влияния рецепторного антагониста ИЛ-1 на ряд показателей функционального статуса крыс в условиях экспериментального геморрагического инсульта. Рецепторный антагонист ИЛ-1 (ИЛ-1ra) получен в Санкт-Петербургском НИИ особо чистых биопрепаратов путем генной трансформации бактерий *E. coli*.

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 3 группы по 10 крыс. Первая группа — ложнооперированные животные, вторая — контрольная патология (животные с ВМК), третья — животные с патологией, которым вводили рецепторный антагонист ИЛ-1 в дозе 7,5 мг/кг (ЕД₅₀ по церебропротекторной активности). Препарат вводили внутримышечно — сразу после выхода животных из наркоза, в дальнейшем — 1 раз в сутки в течение острого периода ишемии (4 дня) и фазы восстановления (18 дней). Оценивали выживаемость крыс и динамику развития постишемических нарушений в указанные периоды наблюдения. По истечении указанных сроков животных выводили из эксперимента под этаминал-натриевым наркозом путем декапитации. Мозг быстро извлекали, отделяли височные доли, которые гомогенизировали в жидком азоте. В гомогенате мозга определяли открытие митохондриальной поры (МП) после инициации циклоспорином-А и мембранный потенциал заряда митохондрий (МПЗМ) в присутствии сафронина-О [10]. Кроме того, в гомогенате мозга биохимическими методами определяли уровень адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) [11], а также содержание продуктов окислительной модификации белка (по уровню альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов) [12].

Оставшийся мозг фиксировали в 10 % жидкости Буэна (24 часа) и по стандартной схеме заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные фронтальные 15-микронные гистологические срезы в области постцентральной извилины (сомато-сенсорная

кора). Для виявлення експресії с-Fos-белка в сенсорній зоні кори використовували імуногістохімічний метод непрямої імунофлуоресценції [13]. На срези наносили первичні антитела к белку с-Fos (Sigma Chemical, USA), інкубували 24 часа при температурі +4° С, после чего срезы трижды промивали 0,1 М фосфатним буфером. Затем на образцы наносили вторичні антитела (флуоресцент кон'югований козий IgG, Sigma Chemical, USA), інкубували при комнатной температурі 60 мин, после чего промывали срезы 0,1 М фосфатним буфером. На флуоресцентном микроскопе Axioskop (Zeiss, Germany) исследование Fos-иммунопозитивных нейронов осуществляли при помощи видеокамеры COHU-4922 (USA) и вводили в систему цифрового анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany). Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 6.0» (Statistica Inc. USA). Полученные результаты были проанализированы с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента, достоверность относительных величин оценивали применением критерия χ^2 . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95 % ($p < 0,05$), которые отмечали как $p^{ЛО}$ (относительно группы ложнооперированных животных) или $p^{КП}$ (относительно группы контрольной патологии).

В ходе эксперимента после операции в группе контрольной патологии случаи гибели крыс отмечались до 7 суток включительно (рис. 1), показатель выживаемости уменьшился с 50 % в первые сутки до 30 % на 5—7 сутки. Во всех группах крыс, получавших рецепторный антагонист IL-1, гибель животных отмечена только на протяжении первых суток, показатель летальности составил 40 %.

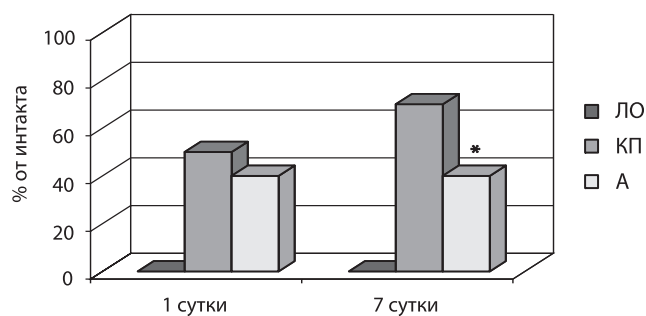


Рис. 1. Влияние рецепторного антагониста IL-1 на выживаемость крыс при экспериментальном геморрагическом инсульте

Примечания ко всем рисункам:

ЛО — группа ложнооперированных животных; КП — группа контрольной патологии; А — группа АРИЛ в дозе 7,5 мг/кг.

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

При острой церебральной ишемии происходят каскадные последовательные биохимические и патофизиологические изменения. Снижение мозгового кровотока 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 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 [14].

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, продуцируемый в ответ на гипоксию IL-1 экспрессирует в глиальных клетках индуцибельную NOS (iNOS), что ведет к гиперпродукции NO и токсическим эффектам его избыточных количеств. 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 [15].

В условиях ишемии/гипоксии на фоне сверхвысоких уровней NO и его метаболитов развивается дисфункция митохондрий, которая приводит к нарушению ионного транспорта, генерации и проведения импульса; активации «паразитарных» энергопродуцирующих реакций и значимой потере энергетических запасов нейрональной клетки. Под действием гидроксил-радикала происходит открытие митохондриальных пор с экспрессией и выходом в цитозоль проапоптотических белков. Данные экспериментов подтверждают, что нарушение кислородного режима тканей, гиперпродукция эксайтотоксичных аминокислот, повреждение мембраны митохондриальной усиливает открытие неселективных пор и высвобождение апоптогенных белков из поврежденных митохондрий [16].

Наши исследования показали, что рецепторный антагонист IL-1 способен ограничивать действие нитрозирующего стресса на нейроны, что привело к нормализации открытия митохондриальной поры и повышению мембранного потенциала заряда митохондрий ($p^{КП} < 0,001$) (рис. 2 и 3). Возможно, это связано с моделированием активности митохондриальной NO-синтазы, что регулирует открытие митохондриальной поры и уменьшает тем самым проявления митохондриальной дисфункции.

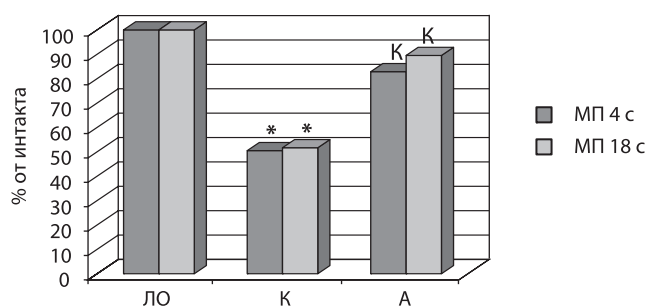


Рис. 2. Влияние АРИЛ на открытие митохондриальной поры (МП) митохондрий нейроцитов крыс с внутримозговым кровоизлиянием

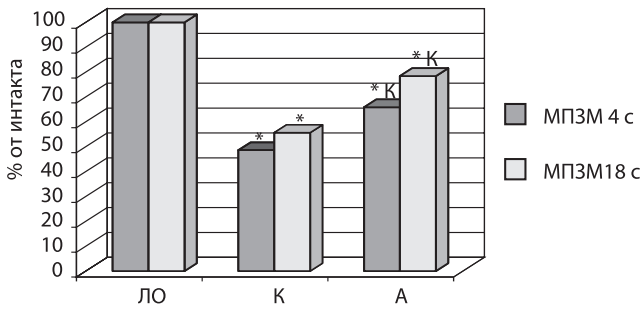


Рис. 3. Влияние АРИЛ на мембранный потенциал заряда митохондрий (МПЗМ) нейроцитов крыс с ВМК

В условиях ГИ развитие дисфункции митохондрий нарушает состояние митохондриальных ферментных комплексов и приводит к подавлению аэробного синтеза макроэргических фосфатов и энергозависимых функций клеток, в результате чего развивается биоэнергетическая гипоксия. При этом изменения в пуле макроэргов предшествуют изменениям других функционально-метаболических показателей жизнедеятельности клетки [17, 18].

Введение аутокрови в группе КП (рис. 4) привело к значительному снижению АТФ и АДФ в остром периоде ($p^{ЛО} < 0,001$) с повышением в периоде восстановления, однако и к 18 суткам он был ниже начального на 54 % ($p^{ЛО} < 0,001$). Количество АМФ на всем протяжении эксперимента было повышено — в остром периоде на 58 % ($p^{ЛО} < 0,001$), в восстановительном периоде — на 32 % ($p^{ЛО} < 0,01$), что отражает преобладание распада АТФ на фоне снижения синтеза.

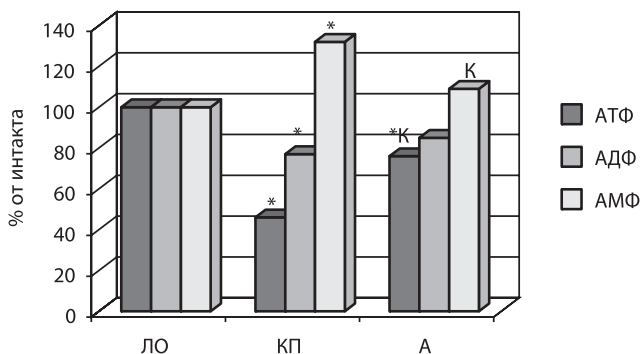


Рис. 4. Содержание адениловых нуклеотидов в мозге крыс с ВМК

Применение при геморрагическом повреждении ткани мозга рецепторного антагониста IL-1 уже к 4 суткам привело к повышению уровней АТФ ($p^{ЛО} < 0,001$) и АДФ ($p^{КП} < 0,05$) на фоне выраженного снижения АМФ ($p^{ЛО} < 0,01$, $p^{КП} < 0,05$). В период восстановления на фоне коррекции IL-1га показатели энергетического обмена стабилизировались и практически достигли первоначального уровня (АТФ и АДФ $p^{КП} < 0,001$, АМФ $p^{КП} < 0,05$).

При ГИ снижение поступления в нейроны молекулярного кислорода стимулирует образование активных форм кислорода (АФК). В нормальных условиях концентрация АФК регулируется их дезактивацией

ферментными и неферментными эндогенными антиоксидантами. Геморрагическое повреждение ткани мозга в условиях резкой активации окислительных процессов и недостаточной эффективности антиоксидантной защиты приводит к развитию окислительного стресса [19].

Основным источником образования АФК является митохондриальное окислительное фосфорилирование. Нарушения в любом из митохондриальных ферментных комплексов дыхательной цепи могут привести к генерации АФК и развитию окислительного стресса в ткани головного мозга. Имеют значение также Ca^{2+} -зависимые ферментативные реакции аутоокисления аминов и синтез простагландинов и лейкотриенов. Важную роль играет образование АФК в реакции образования ксантиноксидазы из ксантиндегидрогеназы под действием Ca^{2+} -зависимого кальпаина-1. При этом происходит окисление ксантина, накопление большого количества супероксидного анион-радикала O_2^- и развитие окислительного стресса. Значимым является также образование АФК и вторичных свободнорадикальных метаболитов — продуктов ПОЛ — в результате накопления арахидоновой кислоты, синтеза простагландинов и лейкотриенов. Повышение уровней АФК стимулирует синтез транскрипционного фактора, индуцируемого при гипоксии (HIF), активацию HIF-1-зависимых генов, синтез провоспалительных цитокинов (в том числе IL-1) и формирует порочный круг вторичных повреждений [20]. Повреждающее действие АФК связано с блокадой SH-групп ферментов и их инактивацией, гидроксигированием оснований ДНК и ее фрагментацией, активацией реакций ПОЛ мембран, прямой деструкции нуклеиновых кислот и окислительной модификации белка (ОМБ) [21].

В группе КП введение аутокрови сопровождалось стабильным повышением содержания в коре мозга животных на протяжении всего эксперимента продуктов ОМБ — уровень раннего (АФГ) и позднего (КФГ) маркеров был повышен соответственно в 5,5 и 4,5 раза ($p^{ЛО} < 0,001$) (рис. 5).

В условиях дефицита кислорода при ГИ энергетический дефицит и окислительный стресс активируют срочные регуляторные компенсаторные механизмы, индуцируют экспрессию генов раннего реагирования и активируют механизмы патологической клеточной смерти (некроз) или программированной гибели клеток (апоптоз) [22]. В условиях острой мозговой гипоксии повышение продукции IL-1 с последующим

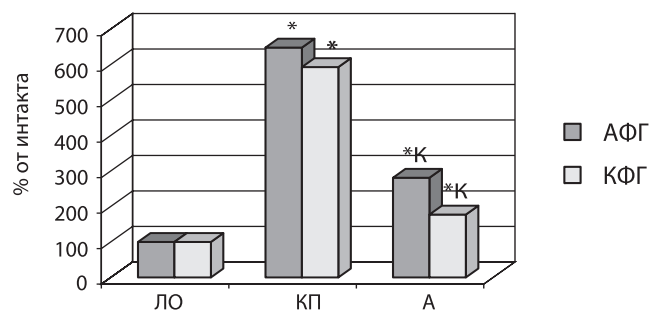


Рис. 5. Показатели окислительной модификации белков в мозге крыс с ВМК

формированием цитокинового каскада сопровождается инфлюксом в зону инициации полиморфно-нуклеарных лейкоцитов, экспрессией лейкоцитарного адгезивного комплекса CD-18/11 и эндотелиальных межклеточных молекул адгезии ICAM-1, избыточной продукцией свободных радикалов, что дополнительно ухудшает состояние нейронов в области геморрагического повреждения. Непосредственно IL-1 экспрессирует в глиальных клетках индуцибельную iNOS, что ведет к гиперпродукции NO, ингибированию белков ферментов дыхательной цепи митохондрий и цикла Кребса, истощению запасов НАД и АТФ и гибели нейронов по пути некроза или апоптоза. В условиях окислительного стресса под действием АФК в клетке происходит активация экспрессии редокс-чувствительных генов апоптоза раннего реагирования — преимущественно JunD и c-Fos [23].



Рис. 6. Содержание c-Fos- и Vcl-2-положительных клеток в мозге крыс на 18 сутки после ВМК

В условиях экспериментального ВМК к 4 суткам отмечено снижение уровней белков c-Fos и Vcl-2 более, чем в 2 раза, что отражает преобладание процессов некроза нейронов в острой стадии процесса. В дальнейшем наблюдается частичное восстановление количества c-Fos и Vcl-2 в нейронах 3—5 слоев коры головного мозга (рис. 6). При введении рецепторного антагониста IL-1 наблюдается постепенная стабилизация количества белка c-Fos и Vcl-2 с максимальным проявлением активности в восстановительном периоде ($p^{КП} < 0,01$). Можно предположить, что после ВМК на фоне применения IL-1ra происходит адаптация клеток коры головного мозга в зоне повреждения — торможение некроза нейронов, активация апоптоза и оптимизация постинсультных последствий.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что в сравнении с ложнооперированными животными у крыс с ВМК проявились признаки митохондриальной дисфункции, энергетического дефицита и окислительного стресса, активации процессов некроза, что привело к гибели животных в группе.

Применение рецепторного антагониста IL-1 у животных с ВМК повышает их выживаемость, стабилизирует состояние митохондрий и энергетический

обмен, предупреждает развитие процессов ОМБ и стабилизирует экспрессию генов раннего реагирования. Эти эффекты определяются способностью рецепторного антагониста IL-1 при геморрагическом повреждении мозга как блокировать эффекты избыточных количеств провоспалительного IL-1, так и активировать противовоспалительное звено цитокинового каскада, что снижает выраженность локального воспаления и постинсультные нейрональные потери. Полученные в настоящей работе данные подтверждают наличие у рецепторного антагониста IL-1 нейропротекторных свойств.

Список литературы

1. Виленский Б. С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение / Б. С. Виленский. — СПб.: Фолиант, 2002. — 397 с.
2. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Гусев Е. И., Скворцова В. И. — М.: Медицина, 2001. — 328 с.
3. Герасимова М. М. Роль аутоиммунного процесса в патогенезе геморрагического инсульта / Герасимова М. М., Антипина Ю. В. // Инсульт. — 2003. — № 8. — С. 48—52.
4. Деев А. С. Причинные факторы, течение и исходы геморрагического инсульта в молодом возрасте / Деев А. С., Захарушкина И. В. // Неврологический журнал. — 2001. — № 5. — С. 15—17.
5. 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.
6. Blum A. Role of cytokines in heart failure / Blum A., Miller H. // Am. Heart. J. — 1998. — Vol. 135. — P. 181—186.
7. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke / Ferrarese C., Mscarucci P., Zoai C. et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1999. — Vol. 19, № 9. — P. 1004—1009.
8. Скворцова В. И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии / В. И. Скворцова // Инсульт. — 2003. — № 9. — С. 20—22.
9. Супрун Е. В. Дослідження антигіпоксичної дії АРІЛ-1 / Е. В. Супрун // Экспериментальная и клиническая медицина. — 2008. — № 2. — С. 56—58.
10. Аكوпова Л. В. Снижение чувствительности митохондрий к Ca²⁺-зависимому открытию поры в условиях длительной инкубации / Аكوпова Л. В., Сагач В. Ф. // Укр. биохим. журнал. — 2004. — Т. 76, № 35. — С. 61—65.
11. Прохорова М. И. Современные методы в биохимии (углеродный и энергетический обмен) / М. И. Прохорова. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1986. — 368 с.
12. Дубкина О. Ю. Окислявальний стрес і окислявальна модифікація білків / О. Ю. Дубкина // Мед. хімія. — 2001. — Т. 3, № 2. — С. 43—45.
13. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. — М., 1962. — 962 с.
14. Защищающие и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота / [Манухина Е. Б., Дауни Х. Ф., Маллет Р. Т., Малышев И. Ю.] // Вестник Российской АМН. — 2007. — № 2. — С. 27—33.
15. Functional role of interleukin-1 β in IL-1 β converting enzyme-mediated apoptosis / [Fridlander R. M., Gardiardi V., Rotello R. J., Yuan H.] // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 184. — P. 717—724.
16. Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция цереброкурином / [Беленичев И. Ф., Колесник Ю. М., Павлов С. В. и др.] // Международный неврологический журнал. — 2008. — № 4 (20). — С. 23—29.
17. Лукьянова Л. Д. Биоэнергетическая гипоксия — молекулярный механизм тканевой гипоксии и адаптация организма / Л. Д. Лукьянова // Физиол. укр. журнал. — 2003. — Т. 49, № 3. — С. 17—35.
18. Дудченко А. М. Параметры аденилатного пула как предикторы нарушений энергетического обмена в гепатоцитах при гипоксии / Дудченко А. М., Лукьянова Л. Д. // Бюлл. exper. биол. — 2003. — Т. 136, № 7. — С. 41—44.
19. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях (Огляд літератури) / [Губський Ю. І., Беленичев І. Ф., Коваленко С. І. та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. — 2004. — № 2. — С. 8—15.

20. Факторы транскрипции HIF-1 α , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии / [Сазонтова Т. Г., Жукова А. Г., Анчишина Н. А. и др.] // Вестник РАМН. — 2007. — № 2. — С. 17—25.

21. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / [Губский Ю. И., Беленичев И. Ф., Павлов С. В. и др.] // Совр. пробл. токсикол. — 2005. — № 3. — С. 20—26.

22. Kehler J. P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis / J. P. Kehler // Teratology. — 2000. — 62. — P. 235—246.

23. Влияние NO-синтазы на поведенческие и структурные изменения головного мозга при хроническом стрессе. Ховряков А. В., Кругляков П. П., Айрапетянц М. Г., Сосунов С. А. // Морфология. — 2002. — Т. 121, № 2—3. — С. 167.

Надійшла до редакції 17.08.2010 р.

E. V. Suprun

*Національний фармацевтичний університет
(м. Харків)*

Ефективність цитокінової церебропротекції при експериментальному геморагічному інсульті

На моделі експериментального геморагічного інсульту у щурів (шляхом введення аутокрові у внутрішню капсулу головного мозку) на фоні корекції антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 — АРІЛ-1 (7,5 мг/кг) відзначено нормалізацію показників вуглеводно-енергетичного обміну, вільнорадикальних реакцій та антиоксидантного статусу, активацію апоптозу у нейронах кори головного мозку.

Ключові слова: ІЛ-1, рецепторний антагоніст ІЛ-1, геморагічний інсульт, цитокінова церебропротекція.

E. V. Suprun

National university of Pharmacy (Kharkiv)

Effectiveness of cytokine cerebroprotector in experimental hemorrhagic stroke

On the model of experimental hemorrhagic stroke in rats (by administration of autoblood in internal capsule of brain) on the background of correction the interleukin-1 receptor antagonist — IL-1Ra (7.5 mg/kg) was noted increase in percents of survived animals, stabilization of functional activity of mitochondria (by the opening of mitochondrial pore), levels of energetic exchange (ATP, ADP, AMP), prevention of activation of oxidative modification of protein (AFG, CFG) and the stabilization of genes of early reaction (c-Fos and Bcl-2) in neurons of brain cortex.

Keywords: IL-1, IL-1Ra, hemorrhagic stroke, cytokine cerebroprotection.