

профілактики постменопаузально-го остеопороза / О. А. Макаренко // Фітотерапія (Часопис). — 2007. — № 4. — С. 28-33.

12. *Левицкий А. П.* Профилактические эффекты растительных адаптогенов и цитрата кальция при фтористой интоксикации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, В. Н. Гороховский // Современные проблемы токсикологии. — 2008. — № 1. — С. 65-68.

13. *Левицкий А. П.* Коррекция метаболизма костной ткани при алиментарном остеопорозе у старых крыс / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. В. Ходаков // Проблемы старения и долголетия. — 2007. — Т. 16, № 3. — С. 240-247.

14. *Метод* определения активности каталазы / М. А. Каролюк, Л. И. Иванова, Н. Т. Майорова, К. Е. Токарев // Лабораторное дело. — 1988. — № 1. — С. 16-18.

15. *Чевари С.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее активности в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лабораторное дело. — 1985. — № 11. — С. 678-681.

16. *Стальная И. Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66-68.

17. *Стальная И. Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 63-64.

18. *Антиоксидантно-прооксидантный* индекс сыворотки крови щуров з експериментальним стоматитом та його корекція зубними еліксирами / А. П. Левицкий, В. М. Почтар, О. А. Макаренко, Л. І. Гридіна // Одеський медичний журнал. — 2006. — № 1. — С. 22-25.

19. *Барышева И. А.* Особенности выделения и анализа изофлавонов из растительного сырья / И. А. Барышева, О. А. Макаренко, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. — 2006. — № 3 (53), Спецвипуск. — С. 9.

УДК 615.21:616:831-005.4

Е. В. Супрун

ВПЛИВ РОНКОЛЕЙКИНУ НА ПОКАЗНИКИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ БІЛАТЕРАЛЬНОЇ ОКЛЮЗІЇ ЗАГАЛЬНИХ СОННИХ АРТЕРІЙ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Останніми роками зростає поширеність ішемічних ушкоджень головного мозку серед населення промислово розвинених країн. Щороку в країнах Європи реєструється більше 500 тис. нових випадків інсульту, з яких летально завершується кожен третій. Пацієнти з інсультом потребують тривалого та дорогого лікування з подальшою реабілітацією, які, однак, не можуть повністю запобігти розвитку тяжких віддалених наслідків соціальної, фізичної та психічної дезадаптації [1].

На тлі наростаючої ішемії зниження кровотоку супроводжується формуванням мітохондріальної дисфункції та енергетичного дефіциту, розвитком глутаматкальцієвого каскаду і дестабілізацією клітинних мембран. У тканині головного мозку ступінь виразності функціонально-метаболічних змін, прогресуючи, зменшується від цент-

ру до периферії ушкодження і пов'язана з агресивним впливом активізованих ішемією клітин глії (у першу чергу — мікроглії) на життєздатні нейрони пенумбри шляхом вторинного ушкодження мозку. Доведено, що навіть у віддалених від ішемічного «ядра» ділянках виявляють вторинні зміни мозкового кровотоку й енергетичного метаболізму мозку, тобто «неврологічні депресії» [1; 2]. Тому для ефективного захисту тканини мозку при ішемічному інсульті (ІшІ) в перспективі потрібні нові церебропротективні препарати з енерготропною дією.

Особливе значення серед механізмів вторинного ушкодження тканини мозку мають реакції локального запалення навколо зони «ядра» інфаркту, а саме, різкий підйом рівнів прозапальних медіаторів — цитокінів, які визначають ступінь

виразності запальної реакції, умови для негайної або відстроченої загибелі клітин навколо первинного некрозу і розміри остаточного постішемічного дефекту мозку [3; 4]. До прозапальних цитокінів належать інтерлейкіни (IL-1, IL-6, IL-8) і фактор некрозу пухлин (TNF- α). При взаємодії прозапальних цитокінів із рецепторами активуються ядерні фактори транскрипції AP-1 і NK-kF, що змінює поведінку клітини-мішені і призводить до розвитку гострофазової клітинної відповіді, метаболічної дисфункції й експресії генів раннього реагування [5; 6].

Першим із прозапальних цитокінів у зоні ішемії продукується IL-1, який також має властивість стимулювати проліферацію антигенчутливих Т-лімфоцитів. Сам по собі IL-1 не є ростовим чинником для Т-лімфоцитів. Механізм його дії полягає в індукції синтезу росто-



вих факторів, що секретуються Т-хелперами, — IL-2 та IL-4. Крім того, IL-1 посилює експресію рецепторів до IL-2 та IL-4, що створює умови для аутокринної регуляції проліферації Т-хелперів [7].

Інтерлейкін-2 — один із основних учасників реалізації специфічного сигналу від антигену і коstimулюючого сигналу від В7 антигенпрезентуючих клітин. Він індукує проліферацію В-лімфоцитів, активує цитотоксичні Т-лімфоцити, стимулює природні кілери і генерує лімфокін-активовані кілери (LAK). Також встановлено, що IL-2 стимулює синтез і секрецію цілої низки інших лімфокінів: IL-4, IL-6, гамма-інтерферону, колоній-стимулювальних факторів (CSFs), факторів некрозу пухлин (TNFs).

Основними продуцентами IL-2 є Т-хелпери. Субпопуляція цих клітин неоднорідна за таким показником, як синтез різних цитокінів, але приблизно 75 % її клітин синтезують саме IL-2. Незабаром після відкриття IL-2 була виявлена його протипухлинна активність, що сприяло розвитку імунотерапії злоякісних пухлин як самостійного методу лікування. Терапевтичний вплив на імунну систему вважається доцільним і при неврологічній патології, однак припускають, що він не має патогенетичного значення, отже, не є обов'язковим. Для відновлення імунних порушень при ІшІ різні автори використовували електромагнітну стимуляцію кори головного мозку, мієлопід, тимоптин, нуклеїнат натрію, плаферон-ЛБ, Т-активін [8]. У комплексному лікуванні ІшІ також пропонували використовувати рекомбінантний IL-2 (Ронколейкін®) як основний медіатор клітинного імунітету для профілактики інфекційних ускладнень [9].

Оскільки при ішемічному ушкодженні мозку формування патофізіологічних змін взаємопов'язане з формуванням «цитокінового каскаду», метою цієї

роботи стало вивчення впливу рекомбінантного IL-2 (Ронколейкіну) на деякі ланки патогенезу ІшІ, а саме, на динаміку показників енергозабезпечення та вуглеводного обміну, окиснювальної модифікації білка (ОМБ) і апоптотичних змін у тканинах головного мозку щурів з експериментальним ІшІ.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах масою 180–200 г з розплідника ІФТ НАМН України. Тварин утримували на стандартному раціоні виварію при природній зміні дня і ночі. Усі процедури й оперативні втручання здійснювали відповідно до «Положення про використання лабораторних тварин в біомедичних дослідженнях». Гостре порушення мозкового кровообігу (ГПМК) викликали необоротною двосторонньою оклюзією загальних сонних артерій — під етаміналнатрієвим наркозом (40 мг/кг) за допомогою хірургічного доступу виділяли загальні сонні артерії, підводили під них шовкові лігатури і перев'язували.

Тварини були розділені на 3 групи по 10 особин. Перша група — удавано оперовані тварини (УО), друга — тварини з ГПМК (контрольна патологія — група КП), третя — тварини з патологією, яким вводили Ронколейкін (група Р) дозою 0,01 мг/кг внутрішньом'язово відразу після виходу тварин з наркозу і надалі 1 раз на добу протягом 18 днів. Після закінчення гострого періоду ішемії (4 дні) і фази відновлення (18 днів) тварин виводили з експерименту під етаміналнатрієвим наркозом шляхом декапітації. Мозок швидко вилучали, відокремлювали скроневі частки, які гомогенізували в рідкому азоті. У гомогенаті мозку для оцінки процесів вуглеводноенергетичного обміну й окиснення у циклі Кребса визначали рівні аденолових нуклеоти-

дів (АТФ, АДФ, АМФ), а також пірувату, лактату, малату. Стан ОМБ оцінювали за рівнем альдегідних (АФГ) і карбоксильних (КФГ) продуктів. Для виявлення експресії апоптотичних клітин у сенсомоторній зоні кори використовували імуногістохімічні методи непрямой імуофлуоресценції. Отримані дані були проаналізовані варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Стьюдента (t). Вірогідними вважали відмінності з рівнем значення більше 95 % ($P < 0,05$), які відзначали як $P^{УО}$ (відносно групи УО) або $P^{КП}$ (відносно групи КП).

Результати дослідження та їх обговорення

За умов гострої мозкової гіпоксії формування цитокінового каскаду супроводжується інфлюксом у зону ініціації поліморфно-нуклеарних лейкоцитів, експресією лейкоцитарного адгезивного комплексу й ендотеліальних міжклітинних молекул адгезії ICAM-1, надлишковою продукцією ліпідних медіаторів і вільних радикалів, що додатково погіршує стан нейронів у ділянці ішемічного ушкодження. Безпосередньо IL-1 експресує у гліальних клітинах індукцибельну синтазу оксиду азоту (iNOS), що веде до гіперпродукції NO і токсичних ефектів його надлишкових рівнів. Надлишок NO нітрозилує білки-ферменти дихального ланцюга мітохондрій і циклу Кребса й інгібує їх. За механізмом ланцюгової реакції вільнорадикальні субстрати прискорюють загибель нейронів шляхом пригнічення активності залізо-сульфідних ферментів циклу Кребса та ланцюга перенесення електронів [5; 6].

Дихальний ланцюг за умов гіпоксії виконує роль регулятора і модулятора споживання кисню і доставки його з позаклітинного простору до мітохондрій, сигналізує про зміну вмісту кисню і запускає каскад



функціонально-метаболических внутрішньоклітинних реакцій у відповідь на брак кисню. Наслідком дефіциту кисню є дисфункція мітохондріального апарату, що виражається в послідовних фазних змінах активності мітохондріальних ферментних комплексів і призводить до пригнічення аеробного синтезу енергії, енергозалежних функцій і метаболізму клітин, тобто до розвитку біоенергетичної гіпоксії [10].

Двостороннє перев'язування загальних сонних артерій у групі КП призвело до дисбалансу в тканині мозку пулу макроергічних фосфатів (рис. 1). Відмічено значне зниження АТФ — до 69 % на 4-ту добу експерименту ($P^{УО} < 0,001$) з тенденцією в періоді відновлення до його підвищення, однак і на 18-ту добу він був удвічі нижчим за початковий рівень ($P^{УО} < 0,01$). Рівень АДФ також знижувався, мав схожу динаміку, але рівень змін щодо УО був невірогідним. Рівень АМФ за умов експериментальної ішемії був підвищеним протягом усього експерименту, вірогідно відрізнявся від рівня у групі УО, перевищуючи його у гострому періоді на 64 % ($P^{УО} < 0,001$), у відновлювальному періоді — на 52 % ($P^{УО} < 0,01$). Це адекватно зниженню в ці періоди АТФ і, ймовірно, відображає його посилений розпад при ішемічному ушкодженні. Застосування Ронколейкіну на тлі двостороннього перев'язування загальних сонних артерій на 18-ту добу призвело до збільшення синтезу АТФ практично до рівня УО ($P^{КП} < 0,001$) на тлі вираженого зниження АМФ ($P^{КП} < 0,001$).

Зміни в пулі макроергів є передумовою змін інших функціонально-метаболических показників життєдіяльності клітини. У стадії енергетичних порушень відбуваються збільшення проникності мембран і активація вільнорадикальних процесів, у тому числі посилення процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та ОМБ, а також гіпер-

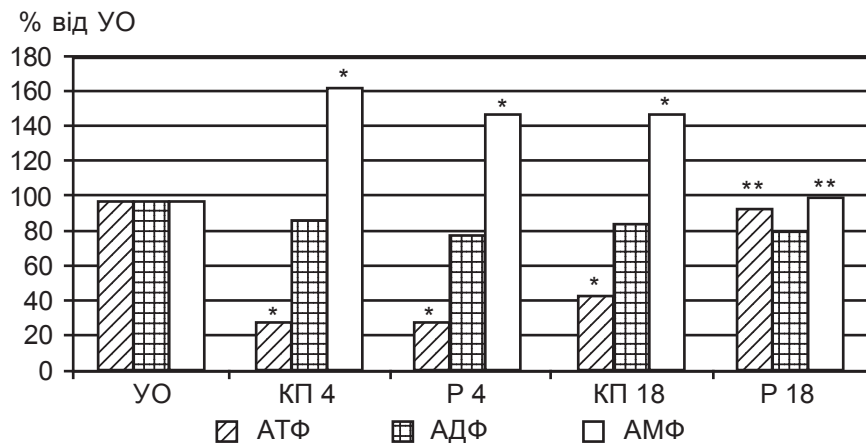


Рис. 1. Вміст аденілових нуклеотидів у мозку щурів із церебральною ішемією. На рис. 1—4: УО — група удавано оперованих тварин; КП 4, КП 18 — група контрольної патології на 4-ту та 18-ту добу дослідження; Р 4 та Р 18 — група Ронколейкіну на 4-ту та 18-ту добу дослідження; * — відхилення вірогідні відносно УО ($P \leq 0,05$); ** — відхилення вірогідні відносно КП ($P \leq 0,05$)

продукція оксиду азоту та порушення вуглеводного обміну. Зниження вмісту АТФ в ішемізованій тканині мозку призводить до компенсаторної активації анаеробного гліколізу і посилення утворення лактату й іонів водню, що зумовлює розвиток метаболічного ацидозу. Тканинний ацидоз відіграє важливу роль у переході від селективного нейронального некрозу до інфаркту мозку. Ацидоз пригнічує метаболічні реакції й іонний транспорт, при цьому гальмування кальцієвого струму спрямоване на енергетично ослаблену тканину і посилює ушкоджувальну дію ацидозу. Внутрішньоклітинний ацидоз призводить до подальшого нагромадження внутрішньоклітинних іонів Ca^{2+} і додаткової активації патогенетичних механізмів, які ними запускаються: це поглиблення оксидантного стресу, надлишкового синтезу оксиду азоту й активації внутрішньоклітинних ферментів. Зниження рН внутрішньо- і позаклітинного середовища чинить також безпосередню цитотоксичну дію, змінюючи властивості мембран, спричинюючи їхню «пухкість», що підвищує проникність ендотелію судин і нейронів. Таким чином, ацидоз справляє комплексну ушкоджувальну дію на

клітини ішемізованих ділянок мозку [7; 10].

Вивчення показників вуглеводного обміну в групі КП підтверджує розвиток за умов ішемічного ушкодження тканини мозку некомпенсованого ацидозу (підвищення рівня лактату в 2,7 і 2,5 рази у різні періоди ішемії, $P^{УО} < 0,01$) на тлі зниження вмісту пірувату і малату (практично вдвічі, $P^{УО} < 0,01$) (рис. 2). Застосування Ронколейкіну на тлі двостороннього перев'язування загальних сонних артерій спричинило нормалізацію синтезу АТФ за рахунок аеробного й анаеробного шляхів окиснення, про що свідчить підвищення рівня малату і пірувату на 18-ту добу практично до рівня інтактних тварин ($P^{КП} < 0,01$). Вміст лактату при цьому в відновлювальному періоді знижується щодо КП на 35 % ($P^{КП} < 0,05$).

Надмірне внутрішньоклітинне нагромадження іонів Ca^{2+} при ішемії та перехід його в активну форму за допомогою сполучення з кальмодуліном активує кальмодулін-залежні внутрішньоклітинні ферменти — фосфоліпази, протеїнази, ендонуклеази, що призводить до ушкодження біомолекул, а в результаті — до загибелі клітин. Зниження надходження молекулярного кисню в нейрони



стимулює утворення активних форм кисню (АФК), які ініціюють процеси вільнорадикального окиснення і ПОЛ. Високореакційні радикали кисню спричинюють окиснення біомолекул, ініціюючи ланцюгові реакції перекисного окиснення в мембранних ліпідах, пряму деструкцію нуклеїнових кислот і окиснювальну модифікацію білка [11].

В експерименті протягом усього періоду спостереження церебральна ішемія супроводжувалася підвищеним вмістом продуктів ОМБ у корі мозку тварин із ГПМК порівняно з групою КП — у 6 разів на 4-ту добу експерименту і в 4,5 рази — на 18-ту добу ($P^{УО} < 0,001$) (рис. 3). На тлі застосування Ронколейкіну відзначено гальмування процесу вільнорадикального ушкодження білків, показники ОМБ у групі на 18-ту добу були на 72–73 % нижчими щодо групи КП ($P^{КП} < 0,01$).

Підвищення рівнів АФК стимулює синтез транскрипційного фактора, що індукується при гіпоксії (HIF), активацію HIF-1-залежних генів і подальший синтез прозапальних цитокінів. За умов дефіциту кисню при ІшІ енергетичний дефіцит і надлишок NO активують строкові регуляторні компенсаторні механізми, індукують експресію генів раннього реагування й активують механізми патологічної клітинної смерті (некроз) або програмованої загибелі клітин (апоптоз). Унаслідок експресії IL-1 iNOS, розвитку гіперпродукції NO відбуваються активація експресії редокс-чутливих генів апоптозу раннього реагування і процес апоптотичної загибелі нейронів [11; 12].

За умов експериментально-го ІшІ у групі КП на 4-ту добу відмічено підвищення рівня апоптотичних клітин майже втричі, що відображає активацію процесів апоптозу нейронів у гострій постішемичній стадії (рис. 4). На 18-ту добу рівень апоптотичних клітин дещо знизився, однак перевищував рі-

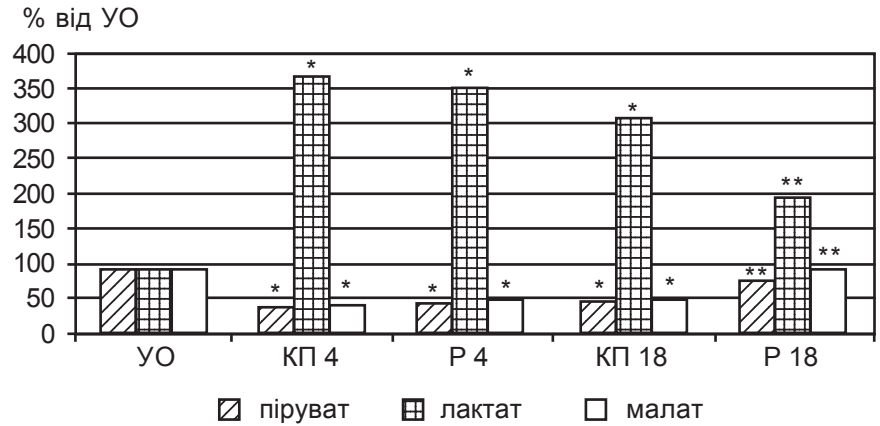


Рис. 2. Показники вуглеводного обміну в мозку щурів із церебральною ішемією

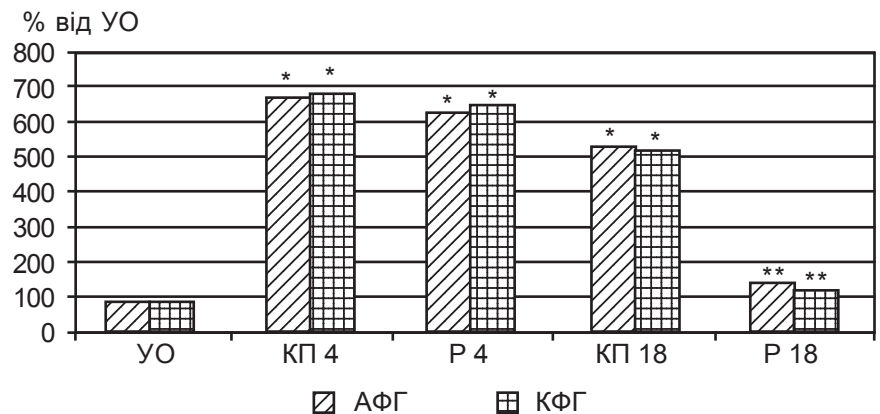


Рис. 3. Показники окиснювальної модифікації білка в мозку щурів із церебральною ішемією

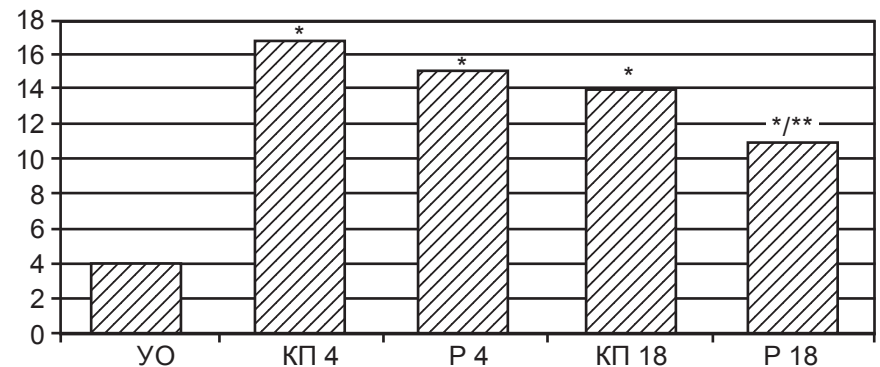


Рис. 4. Частка апоптотичних клітин у мозку щурів із церебральною ішемією

вень УО тварин в 2,5 рази ($P^{УО} < 0,001$). При введенні Ронколейкіну спостерігається поступове зниження рівня апоптотичних клітин у тканині мозку щурів з ($P^{КП} < 0,05$), тобто відбувається постішемична адаптація клітин кори головного мозку в зоні ушкодження — гальмування апоптозу нейронів і

оптимізація постінсультних наслідків.

Висновки

На моделі ішемічного інсульту (шляхом двостороннього перев'язування загальних сонних артерій) доведено наявність у Ронколейкіну енерготропної дії: це активація синтезу АТФ на



тлі стабілізації рівня АМФ, нормалізація реакцій у циклі Кребса (підвищення рівнів пірувату і малату на тлі зниження лактату), стабілізація окиснювальної модифікації білків і апоптотичної загибелі нейронів. Зазначені ефекти Ронколейкіну дозволяють припускати можливість використання його в перспективі як ефективного церебропротектора.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. — М. : Медицина, 2001. — 328 с.
2. Скворцова В. И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии / В. И. Скворцова // Инсулт. — 2003. — № 9. — С. 20-22.
3. Blum A. Role of cytokines in heart failure / A. Blum, H. Miller // Am. Heart. J. — 1998. — Vol. 135. — P. 181-186.

4. *Increas cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke* / С. Ferrarese, P. Mscarucci, С. Zoai [et al.] // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 1999. — Vol. 19, N 9. — P. 1004-1009.

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

6. *Functional role of interleukin-1 β in IL-1 β converting enzyme-mediated apoptosis* / R. M. Fridlander, V. Gardiandini, R. J. Rotello, H. Yuan // J. Exp. Med. — 1996. — Vol. 184. — P. 717-724.

7. *Reduced IL-2 but elevated IL-4, IL-6, and IgE serum levels in patients with cerebral infarction during the acute stage* / H. M. Kim, H. Y. Shin, H. J. Jeong [et al.] // J. Mol. Neurosci. — 2000. — Vol. 14 (3). — P. 191-196.

8. *Нейроиммунопатология* : руководство / Г. Н. Крыжановский, С. В. Магаева, С. В. Макаров [и др.]. — М. : Изд-во НИИ общей патологии и патофизиологии, 2003. — 438 с.

9. *Кашаева Л. Н.* Иммунологические нарушения при церебральных инсультах и их коррекция Ронколейкином® : метод. рекомендации / Л. Н. Кашаева, Л. М. Карзакова, В. Н. Саперов. — Чебоксары, 2005. — 27 с.

10. Лукьянова Л. Д. Энерготропное, антигипоксическое и антиоксидантное действие флавоноидов инсульта / Л. Д. Лукьянова, Э. Л. Германова, А. И. Лыско // Вестник РАМН. — 2007. — № 2. — С. 55-61.

11. *Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях* : обзор литературы / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов [и др.] // Современные проблемы токсикологии. — 2005. — № 3. — С. 20-26.

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

Передплачуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті
Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

