

ЗМІНИ ВМІСТУ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1 ПІД ВПЛИВОМ РЕКОМБІНАНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНІСТА ПРИ ІШЕМІЧНОМУ ТА АЛКОГОЛЬНОМУ УРАЖЕННІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

К.Г.Щокіна, С.Ю.Штриголь, С.М.Дроговоз, Т.В.Горбач**,
О.А.Ходаківський****

Національний фармацевтичний університет
Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету*
Харківський національний медичний університет**
Вінницький національний медичний університет***

*Ключові слова: церебральна ішемія; етаноловий наркоз; інтерлейкін-1;
антагоніст інтерлейкінових рецепторів*

Наведені результати експериментального дослідження вмісту інтерлейкіну-1 на моделях білатеральної каротидної оклюзії у щурів та етанолового наркозу у мишей. Встановлено, що конкурентний рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1 β покращує кровопостачання та зменшує набряк головного мозку, редукує неврологічний дефіцит та поступово знижує вміст інтерлейкіну-1 β . Пригнічення ЦНС етиловим спиртом супроводжується зростанням вмісту інтерлейкіну-1 β . Рекombінантний антагоніст інтерлейкінових рецепторів на відміну від пірацетаму протидіє депримувавальному ефекту етанолу на ЦНС і збільшенню рівня інтерлейкіну-1 β .

Цитокинові механізми гострої та хронічної церебральної недостатності привертають дедалі більшу увагу учених. Доведено, що при різноманітних ураженнях головного мозку зростає продукція інтерлейкінів, у т.ч. інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), швидка експресія якого зумовлює лейкоцитарну інфільтрацію, нейротоксичність, індукує апоптоз нейронів [8, 10]. При церебральній ішемії різного генезу та нейротравмі, при алкогольному ураженні головного мозку антагоністи рецепторів

інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1) збільшують виживаність та зменшують неврологічний дефіцит [3-7, 9]. Поряд із вивченням нейрометаболических аспектів механізму церебропротекторної дії АРІЛ-1 важливо з'ясувати, яким чином при цьому змінюється вміст ІЛ-1, що й склало мету даного дослідження.

Матеріали та методи

Експеримент виконано на білих щурах-самцях масою 200-220 г і білих мишах-самцях масою близько 20 г. Рекombінантний АРІЛ-1

(Санкт-Петербурзький НДІ ОЧБП) в дозі 15 мг/кг, що чинить найбільший церебропротекторний ефект [1], вводили щодня внутрішньом'язово протягом 3 діб, востаннє за 30-40 хв до моделювання порушення мозкового кровообігу (ПМК). ПМК за ішемічним типом у передньомозковому басейні відтворювали шляхом білатеральної каротидної оклюзії (БКО) [2].

В першій серії дослідів визначали динаміку кровопостачання головного мозку при ішемії з подальшою реперфузією. Під кетаміновим наркозом (50 мг/кг внутрішньоочеревинно) препарували судини, підводили провізорні лігатури, накладали датчик ультразвукового флоуметра Т-106 (Transonic Systems Inc., США) на ліву внутрішню сонну артерію. Після стабілізації гемодинаміки вимірювали базальний кровообіг, перев'язували праву артерію та накладали мініатюрний затискач на ліву загальну сонну артерію на

К.Г.Щокіна — канд. фармац. наук, доцент кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

С.Ю.Штриголь — доктор мед. наук, професор кафедри технології ліків та клінічної фармакології з фармацевтичною опією Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Т.В.Горбач — канд. біол. наук, доцент кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету

О.А.Ходаківський — канд. мед. наук, асистент кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова

Таблиця 1

Вплив антагоністів рецепторів інтерлейкіну-1 на кровообіг у внутрішній сонній артерії за умов ішемії-реперфузії головного мозку в щурів, $M \pm m$

Час спостереження	Контроль (n = 7)		АРІЛ-1, 15 мг/кг (n = 7)	
	мл/хв	зміни, %	мл/хв	зміни, %
Вихідний стан				
Перше вимірювання	6,80±0,25	—	6,34±0,15	—
10 хв	6,83±0,22	базальний (100%)	6,43±0,17	базальний (100%)
Ішемія впродовж 40 хв із подальшою реперфузією				
5 хв	3,33±0,11*	-51,2±0,7	5,26±0,17**/***	-17,7±0,6**
30 хв	3,11±0,07*	-53,6±1,2	5,23±0,15**/***	-18,1±0,8**
60 хв	3,19±0,11*	-53,3±0,4	5,16±0,18**/***	-19,2±0,8**

Примітка. Статистично значущі відмінності ($p < 0,05$): * — з вихідним станом усередині групи; ** — із синхронним показником контрольної групи.

40 хв, припиняючи кровопостачання мозку з каротидного басейну. Через 40 хв знімали затискач і визначали кровообіг у лівій внутрішній сонній артерії у динаміці реперфузії протягом 60 хв.

У другій серії дослідів щурам, яким вводили АРІЛ-1 за вищенаведеною схемою, перев'язували обидві загальні сонні артерії. Через 40 хв тварин декапітували. В сироватці крові визначали вміст ІЛ-1 β . Контролем слугували псевдооперовані тварини (наркоз, розріз шкіри, препарування судин без перев'язування), групу контрольної патології склали щури з БКО, яким замість АРІЛ-1 вводили ізотонічний розчин натрію хлориду в аналогічному об'ємі. Ви-

значали масовий коефіцієнт головного мозку, що відбиває набряк органу.

У третій серії дослідів у щурів, що попередньо отримували АРІЛ-1, відтворювали необоротну БКО. Групи порівняння склали псевдооперовані щури, неліковані тварини з БКО (контрольна патологія) і щури, що отримували пірацетам у дозі 200 мг/кг внутрішньоочеревинно у такому ж режимі, як і АРІЛ-1. Через 24 год визначали неврологічний дефіцит за тестом відкритого поля та координацією рухів за тестом стрижня, що обертається. Далі тварин декапітували, визначали ІЛ-1 β у крові та масовий коефіцієнт (МК) головного мозку.

На мишах, яким вводили АРІЛ-1 (15 мг/кг) або пірацетам (200 мг/кг) за вищенаведеною схемою, відтворювали алкогольний наркоз (5,5 г/кг етанолу внутрішньоочеревинно) [2]. Контрольну групу склали тварини, що отримували відповідний об'єм ізотонічного розчину натрію хлориду. В першій серії визначали тривалість бокового положення, в другій через 30 хв після введення етанолу тварин декапітували та визначали в сироватці крові вміст ІЛ-1 β методом імуоферментного аналізу з використанням набору виробництва "Біоконтур" (Санкт-Петербург, Росія) на аналізаторі STATE FAX (США).

Статистичну значущість внутрішньогрупових відмінностей оцінювали за парним критерієм Вілкоксона, міжгрупових — за t-критерієм Стюдента та за відсутності нормального розподілу — за критерієм W. Уайта, при обліку показників в альтернативній формі — за кутовим перетворенням Фішера. Визначали коефіцієнт кореляції між вмістом ІЛ-1 β у крові та показниками масового коефіцієнту головного мозку, неврологічних тестів.

Результати та їх обговорення

АРІЛ-1 не вплинув на базальний кровообіг у внутрішній сонній артерії (табл. 1). Кровопостачання головного мозку при реперфузії через 40 хв ішемії у досліджуваних групах значно від-

Таблиця 2

Вплив антагоністів рецепторів інтерлейкіну-1 на вміст інтерлейкіну-1 β у крові щурів із білатеральною каротидною оклюзією та масовий коефіцієнт головного мозку, $M \pm m$

Тривалість каротидної оклюзії	Вміст інтерлейкіну-1, пкг/мл			
	контроль (псевдооперовані щури)	контрольна патологія (білатеральна каротидна оклюзія)	АРІЛ-1 + білатеральна каротидна оклюзія	пірацетам + білатеральна каротидна оклюзія
40 хв	99,07±7,53 (n = 6)	143,70±24,15* (n = 5)	140,40±16,48* (n = 5)	н/в
24 год	66,23±10,06 (n = 6)	123,85±3,90* (n = 7)	70,09±10,13**/*** (n = 6)	128,60±21,36* (n = 6)
Масовий коефіцієнт головного мозку, % від маси тіла				
40 хв	0,82±0,03 (n = 7)	0,92±0,04 (n = 7)	0,79±0,05 (n = 5)	н/в
24 год	0,82±0,02 (n = 6)	1,14±0,05* (n = 7)	1,00±0,03**/*** (n = 6)	1,16±0,05* (n = 6)

Примітка. Статистично значущі відмінності ($p < 0,05$): * — із псевдооперованим контролем; ** — із контрольною патологією; *** — із групою пірацетаму; н/в — не визначали.

Таблиця 3

Вплив антагоністів рецепторів інтерлейкіну-1 і пірацетаму на неврологічний дефіцит щурів через 24 год білатеральної каротидної оклюзії

Показники	Контроль (псевдооперовані щури), n = 6	Контрольна патологія (БКО), n = 7	АРІЛ-1 + БКО, n = 6	Пірацетам + БКО, n = 6
Тест "відкрите поле", за 3 хв				
Рухові та орієнтовно-дослідницькі реакції:				
— перетнуто квадратів	11,9±3,8	9,5±2,1*	25,5±4,2**/**	5,8±2,4*
— вертикальних стійок	3,3±1,0	2,5±1,1	6,0±0,8**/**	1,2±0,6
— обстежено отворів	5,4±1,0	3,8±0,6	6,3±1,3	2,5±1,5
Емоційні та вегетативні реакції:				
— гримінг	1,1±0,3	0,7±0,3	1,0±0,5	0,3±0,3
— фекальні болюси	0,9±0,4	0,3±0,3	0,2±0,2	0,5±0,3
— уринації	0,3±0,1	0,2±0,2	0,3±0,3	0,2±0,2
— сума показників	2,3±0,8	1,2±0,8	1,5±1,0	1,0±0,6
Сума всіх видів активності	22,9±3,1	17,0±2,9	39,3±6,1**/**	10,5±4,2*
Тест стрижня, що обертається				
Кількість тварин, що впали зі стрижня				
— до 30 с	0/0	4/57,1*	1/16,7**/**	4/66,6*
— до 1 хв	0/0	2/28,6*	1/16,7	1/16,7
— до 5 хв	5/83,3	1/14,3*	4/66,6**/**	1/16,7*
— до 10 хв	1/16,7	0/0	0/0	0/0

Примітка. Статистично значущі відмінності ($p < 0,05$): * — з псевдооперованим контролем; ** — з контрольною патологією; *** — з групою пірацетаму; у числівнику — кількість тварин, що впали зі стрижня, у знаменнику — %.

різнялося. В контролі редукція кровообігу порівняно з базальним становила в середньому 51%, протягом години — 53%. На тлі АРІЛ-1 кровопостачання відновлювалося вірогідно краще: зменшення складало 18-19% ($p < 0,001$). Отже, при ПМК блокада рецепторів ІЛ-1 сприяє посиленню кровопостачання головного мозку після усунення судинної оклюзії.

Через 40 хв БКО рівень ІЛ-1 β у крові щурів групи контрольної патології зростав у середньому на 45% (табл. 2), що відповідає сучасним уявленням про ішемічний каскад. На тлі АРІЛ-1 вміст ІЛ-1 β практично не зменшувався порівняно з групою контрольної патології і перевищував контрольне значення на 41,7%. Проте блокада рецепторів ІЛ-1, як свідчить вимірювання кровопостачання головного мозку (табл. 1), значно зменшувала ступінь церебральної ішемії у найгострішому періоді. В цей час у групі контрольної патології починав розвиватися набряк головного мозку, про що свідчить тенденція до збільшення МК моз-

ку в 1,12 рази. Між вмістом ІЛ-1 β і МК існує сильний додатний кореляційний зв'язок: $r = 0,83$ в групі псевдооперованого контролю, $r = 0,89$ в групі контрольної патології. АРІЛ-1 чинив протинабрякову дію, оскільки МК мозку не відрізнявся від такої в групі псевдооперованого контролю; коефіцієнт кореляції становив $r = 0,93$. Отже, на першій годині хірургічної травми (псевдооперація) та модельної ПМК зростання вмісту ІЛ-1 β сприяє збільшенню МК головного мозку, незважаючи на блокаду рецепторів ІЛ-1.

Протягом першої доби вміст ІЛ-1 β у крові псевдооперованих щурів знизився порівняно з таким через 40 хв у середньому на 33% ($p < 0,05$). Імовірно, більший рівень ІЛ-1 β на першій годині після розрізу та препарування судин відбиває реакцію імунної системи на хірургічну травму. В групі контрольної патології зростання ІЛ-1 β через 24 год БКО сягало 87% порівняно з псевдооперованим контролем (табл. 2). На тлі АРІЛ-1 у цей час вміст ІЛ-1 β

нормалізувався і перевершував рівень псевдооперованих щурів лише на 5,8%. Це можна розцінити як зменшення пошкодження нейронів за рахунок покращення кровопостачання і, можливо, прямого впливу на церебральний метаболізм. Припинення зростання рівня ІЛ-1 протягом першої доби тяжкої церебральної ішемії під впливом блокатора його рецепторів може характеризувати АРІЛ-1 як вторинний нейропротектор, що редукує активацію механізмів пошкодження нейронів, індукованих ішемією. Пірацетам, на противагу АРІЛ-1, не впливав на вміст ІЛ-1 β , рівень якого залишався збільшеним на 94,2%. МК головного мозку — маркер набряку в групі контрольної патології збільшився в 1,39 рази ($p < 0,001$), на тлі пірацетаму — в 1,42 рази ($p < 0,001$), під впливом АРІЛ-1 — в 1,22 рази ($p < 0,001$). Таким чином, набряк мозку в групі АРІЛ-1 був виражений вірогідно менше, ніж у групах порівняння ($p < 0,05$). Зв'язок між МК головного мозку та рівнем ІЛ-1 β у групі псевдооперо-

Таблиця 4

Вплив антагоністів рецепторів інтерлейкіну-1 і пірацетаму на тривалість бокового положення та вміст інтерлейкіну-1 β у крові мишей при етаноловому наркозі, M \pm m

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія (етанол)	АРІЛ-1 + етанол	Пірацетам + етанол
Тривалість бокового положення, хв	—	69,4 \pm 17,6 (n = 7)	23,2 \pm 4,00**/*** (n = 9)	52,4 \pm 6,70 (n = 9)
Вміст ІЛ-1 β у крові через 30 хв, пкг/мл	88,33 \pm 10,52 (n = 6)	169,18 \pm 18,59* (n = 6)	109,42 \pm 12,14** (n = 6)	132,19 \pm 16,10* (n = 7)

Примітка. Статистично значущі відмінності (p<0,05): * — з інтактним контролем; ** — з контрольною патологією; *** — з групою пірацетаму.

ваного контролю протягом доби після втручання якісно змінився ($\rho = -0,50$ проти $\rho = 0,83$ на першій годині); у групі тварин, лікованих АРІЛ-1, $\rho = -0,20$; у групі пірацетаму $\rho = -0,97$. У групі контрольної патології $\rho = 0,25$. Цей слабкий додатний зв'язок свідчить, що наприкінці першої доби ПМК без лікування, на відміну від лікування АРІЛ-1 або пірацетамом, ступінь набряку головного мозку певною мірою контролюється збільшенням вмісту ІЛ-1 β : чим він вище, тим більше набряк.

Через 24 год у щурів із БКО спостерігався неврологічний дефіцит у вигляді зменшення рухової та орієнтовної активності в тесті відкритого поля (табл. 3). Спостерігалася тенденція до зниження локомоторної та дослідницької активності порівняно з інтактним контролем. АРІЛ-1 достовірно підвищував рухову активність, не пригнічував дослідницьку поведінку та не впливав на емоційний стан і достовірно підвищував суму всіх видів активності в 1,7 рази порівняно з інтактними тваринами, в 2,3 рази — порівняно з контрольною патологією, тобто достовірно усував неврологічний дефіцит. На тлі пірацетаму, навпаки, спостерігалася тенденція до збільшення неврологічного дефіциту (сума всіх показників була в 1,6 рази менше, ніж у контрольній патології).

Майже всі інтактні щури утримувались на стрижні, що обер-

тається зі швидкістю 10 об/хв, до 5 хв, один щур — до 10 хв (табл. 3). Неврологічний дефіцит у групі контрольної патології підтверджується міорелаксацією та порушенням координації рухів: 4 тварини (57,1%) втримались на стрижні менше, ніж 30 с; 2 (28,6%) впали в проміжку від 30 с до 1 хв і лише 1 тварина (14,3%) утрималась до 5 хв (табл. 3). АРІЛ-1 покращував неврологічний статус: до 30 с упав лише 1 щур (16,7%); до 1 хв — ще 1 тварина (16,7%); 4 щури (66,6%) утримались до 5 хв. Пірацетам був менш ефективним: досліджуваний показник практично не відрізнявся від такого в групі контрольної патології (табл. 3). Кореляція між тривалістю часу втримання на стрижні та вмістом ІЛ-1 β становила: в контролі $\rho = 0,26$; у групі контрольної патології $\rho = -0,79$; у тварин, лікованих АРІЛ-1, $\rho = 0,14$; на тлі пірацетаму $\rho = 0,39$. Сильний від'ємний зв'язок у групі контрольної патології свідчить, що при ПМК порушення м'язового тону та координації рухів значною мірою залежить від рівня ІЛ-1 β , тимчасом як в обох групах лікованих щурів із БКО і в здорових тварин суттєвого зв'язку між даними показниками немає.

АРІЛ-1 протидіє пригніченню ЦНС етиловим спиртом — в 3 рази зменшував тривалість алкогольного наркозу, а пірацетам скорочував її лише на 24,5% (табл. 4). При цьому в мишей групи контрольної патології сут-

тєво (на 91,5%) зростав вміст ІЛ-1 β . На тлі АРІЛ-1 він перебільшував показник інтактного контролю лише на 23,9%, що не сягало значущого рівня, а на тлі пірацетаму — на 49,7% (p<0,05). Таким чином, алкогольне ураження ЦНС супроводжується типовим механізмом нейротоксичності — накопиченням ІЛ-1, яке попереджається блокадою інтерлейкінових рецепторів.

Отже, на двох різних за етіологією моделях ураження ЦНС — ішемічному та токсичному (алкогольному) встановлено, що в обох випадках вже в ранньому періоді патологічного процесу активуються цитокінові механізми нейротоксичності, які верифікуються значним зростанням рівня ІЛ-1 β у крові. Конкурентний антагоніст рецепторів ІЛ-1 при профілактичному введенні чинить церебропротекторну дію, яка супроводжується зменшенням вмісту ІЛ-1 β — поступовим впродовж першої доби церебральної ішемії та негайним при алкогольній інтоксикації, що розширює уявлення про механізм нейропротекторної дії АРІЛ-1. Пірацетам суттєво не впливає на активацію цитокінових механізмів церебральної недостатності.

ВИСНОВКИ

1. Протягом першої доби білатеральної каротидної оклюзії у щурів поступово зростає вміст інтерлейкіну-1 β у крові. Його конкурентний рецепторний антагоніст із першої години покращує кровопостачання та зменшує набряк головного мозку, редукує неврологічний дефіцит через 24 год та поступово знижує вміст інтерлейкіну-1 β . Пірацетам не впливає на зростання рівня інтерлейкіну-1 β на моделі церебральної ішемії.

2. Пригнічення ЦНС етиловим спиртом супроводжується зростанням вмісту інтерлейкіну-1 β . Рекombінантний антагоніст інтерлейкінових рецепторів протидіє депримуальному ефекту етанолу на ЦНС і збільшенню рівня інтерлейкіну-1 β . Пірацетам значно слабше зменшує вплив алкоголю на ЦНС та зростання інтерлейкіну-1 β .

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. UA 31373 на корисну модель МПК (2006) А 61 К 35/66 Застосування антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 як засобу церебропротекторної дії / Е.В.Супрун, С.Ю.Штриголь, О.М.Іщенко, О.С.Супрун. — № u200711672. — Заявл.: 22.10.2007. Опубл.: 10.04.2008. — Бюл. №7.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ИИА "Ремедиум", 2000. — 398 с.
3. Супрун Е.В., Штриголь С.Ю., Іщенко О.М. //Клін. фармація. — 2009. — Т. 13, №1. — С. 59-63.
4. Щокіна К.Г., Штриголь С.Ю. //Укр. мед. альманах. — 2010. — Т. 13, №4 (додаток). — С. 163.
5. Щокіна К.Г., Штриголь С.Ю. //Укр. вісник психоневрол. — 2009. — Т. 17, Вип. 2 (59), додаток. — С. 105-107.
6. Щокіна К.Г., Штриголь С.Ю., Іщенко О.М. //Укр. журн. клін. та лаб. медицини. — 2010. — Т. 5, №3. — С. 137-140.
7. Banwell V., Sena E.S., Macleod M.R. //J. of Stroke and Cerebrovasc. Dis. — 2009. — Vol. 18, №4. — P. 269-276.
8. Basu A., Krady J.K., O'Malley M. et al. //J. of Neurosci. — 2002. — Vol. 22 (14). — P. 6071-6082.
9. Garcia J.H., Liu K.F., Relton J.K. //Am. J. of Pathol. — 1995. — Vol. 147. — P. 1477-1486.
10. Simi A., Tsakiri N., Wang P., Rothwell N.J. //Biochem. Soc. Transactions. — 2007. — Vol. 35, Part 5. — P. 1122-1126.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 706-30-69.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 03.02.2011 р.