

Рекомендована д.б.н., професором Л.М.Малоштан

УДК 615.21:616:831-005.4

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНІСТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1 ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГЕМОРАГІЧНОМУ ІНСУЛЬТІ

Е.В.Супрун, А.В.Глущенко, О.С.Супрун

Національний фармацевтичний університет

**На моделі експериментального геморагічного інсульту у щурів (шляхом введення аутокрові у внутрішню капсулу головного мозку) на фоні корекції цитокінового дисбалансу рецепторним антагоністом інтерлейкіну-1 — РАІЛ-1 в дозі 7,5 мг/кг відзначено стабілізацію показників ПОЛ (ДК, ТК, МДА), активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, ГПР) та нормалізацію функціональної активності мітохондрій (МП та МПЗМ), модуляцію апоптозу (за часткою апоптотичних клітин і вмістом bcl-2 позитивних клітин).**

Протягом останніх десятиріч у багатьох економічно розвинутих країнах відзначено зростання розповсюдженості геморагічних інсультів (ГІ), які потребують термінового спеціалізованого лікування в стаціонарі та подальшої реабілітації та призводять до довгострокової тимчасової непрацездатності з високим рівнем інвалідизації [2, 7]. Важливе значення в патогенезі ГІ належить надмірній чутливості тканини мозку до нестачі кисню та глюкози, що виникає після порушення мозкового кровообігу. На тлі наростаючої ішемії зниження кровотоку супроводжується розвитком глутамат-кальцієвого каскаду, формуванням мітохондріальної дисфункції та енергетичного дефіциту, окиснювальним стресом і дестабілізацією клітинних мембран [2, 3]. При ГІ каскад молекулярних та патобіохімічних змін формується в чіткій послідовності та має певні часові межі. Для ефективного лікування ГІ необхідно застосовувати нейропротективні препарати комплексної дії, які переривають ланцюг постішемічного патогенезу на більш ранніх етапах, зокрема засоби з антиоксидантною дією [7, 11].

Серед механізмів вторинного пошкодження тканини мозку особливе значення 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 постішемічно-

го дефекту мозку [2, 5]. В першу чергу, підвищується продукція інтерлейкіну-1 (ІЛ-1), який є головним медіатором розвитку місцевої запальної реакції та гострофазової відповіді на рівні організму, координує “цитокіновий каскад” — співвідношення про- та протизапальних медіаторів, що індукує та підтримує запалення в осередку гіпоксії/ішемії, веде до змін мікроциркуляції, гематоенцефалічного бар’єру та віддаленої загибелі нейронів [4, 8].

Експресія ІЛ-1 викликає синтез рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 (РАІЛ-1), який інгібує дію ІЛ-1 шляхом конкурентного зв’язування його специфічних рецепторів мембранного типу I та перешкоджає взаємодії рецептора ІЛ-1 з аксесорним білком, що призводить до відсутності проведення сигналу всередину клітин.

З урахуванням надчутливості тканини мозку до окиснювального стресу та залежності розвитку постішемічних ушкоджень від ефектів “цитокінового каскаду” метою роботи є вивчення антиоксидантної дії препарату інтерлейкінового ряду — РАІЛ-1 на моделі експериментального геморагічного інсульту.

### Матеріали та методи

Антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 отримано в Санкт-Петербурзькому НДІ особливо чистих біопрепаратів шляхом генної трансформації бактерій *E.coli*. Дослідження проводили на білих нелінійних щурах масою 180-200 г. Внутрішньомозковий крововилив (ВМК) викликали введенням аутокрові у внутрішню капсулу головного мозку під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). Тварини були розділені на 3 групи по 10 щурів. Перша група — удавано оперовані тварини (УО), друга — тварини з ВМК (контрольна група), третя — тварини з патологією, яким вводили РАІЛ-1 у дозі 7,5 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 етамінал-натрієвим наркозом шляхом декапітації. У гомогенаті мозку

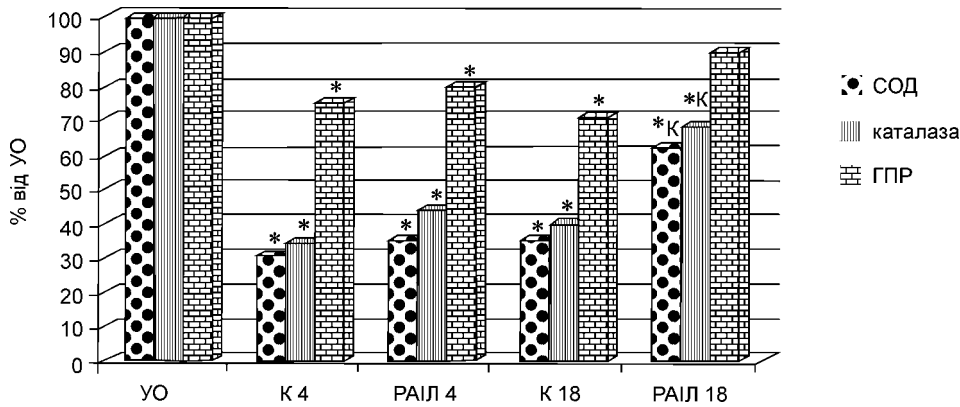


Рис. 1. Показники перекисного окиснення ліпідів у мозку щурів після ВМК.

біохімічними методами визначали вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів (ДК), трієнкетонів (ТК), маленового діальдегіду (МДА)) та антиоксидантну активність (за рівнем супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГПР)). Також у гомогенаті мозку визначали відкриття мітохондріальної пори (МП) після ініціації циклоспорином та мембранний потенціал заряду мітохондрій (МПЗМ) у присутності сафроніну-О. Для виявлення частки апоптотичних клітин та експресії bcl-2-позитивних клітин у сенсомоторній зоні кори щурів використовували імуногістохімічні методи непрямої імунофлуоресценції. Отримані дані були статистично проаналізовані з використанням критерію Стьюдента (t). Вірогідними вважали відмінності з рівнем значення більш ніж 95% ( $p < 0,05$ ), які відзначали як  $p^{УО}$  (відносно групи удавано оперованих тварин) або  $p^K$  (відносно контрольної групи).

#### Результати та їх обговорення

В умовах гострої мозкової ішемії/гіпоксії після ВМК формування цитокінового каскаду супроводжується експресією лейкоцитарного адгезивного комплексу та ендотеліальних міжклітинних молекул адгезії ICAM-1, надлишковою продукцією ліпідних медіаторів та вільних радикалів, що додатково погіршує стан нейронів в області ішемічного ушкодження. Безпосередньо IL-1 експресує у гліальних клітинах індуцибельну синтазу

оксиду азоту (iNOS), що призводить до гіперпродукції NO і токсичних ефектів його надлишкових рівнів. Зниження надходження молекулярного кисню в нейрони стимулює утворення активних форм кисню (АФК), які ініціюють ланцюгові реакції перекисного окиснення в мембранних ліпідах, пряму деструкцію нуклеїнових кислот і окиснювальну модифікацію білка. По механізму ланцюгової реакції вільнорадикальні субстрати ПОЛ прискорюють загибель нейронів шляхом пригнічення активності залізо-сульфідних ферментів циклу Кребса та ланцюга перенесення електронів [3, 4].

У нашому дослідженні протягом усього експерименту в корі мозку тварин з ВМК відзначено стабільне підвищення вмісту продуктів ПОЛ — МДА, ТК, ДК в 2-2,3 рази в порівнянні з контрольною групою ( $p^{УО} < 0,001$ ) (рис. 1). Активізація вільнорадикальних реакцій проходила на тлі пригнічення активності антиоксидантних ферментів — СОД на 69% в гострому та 65% у відновлювальному періодах постішемічного ушкодження ( $p^{УО} < 0,001$ ), каталази відповідно на 66% і 61%, ( $p^{УО} < 0,001$ ), ГПР — на 25% і 29% ( $p^{УО} < 0,05$ ) (рис. 2). При введенні тваринам з ВМК РАІЛ-1 вже на 4 добу відзначено зниження показників ПОЛ на 14-20% ( $p^{УО} < 0,001$ ,  $p^K < 0,05$ ), в подальшому рівні МДА та ТК практично наблизилися до рівня УО тварин. Також стабілізувались показники антиоксидантної системи — на тлі введення РАІЛ-1 в періоді

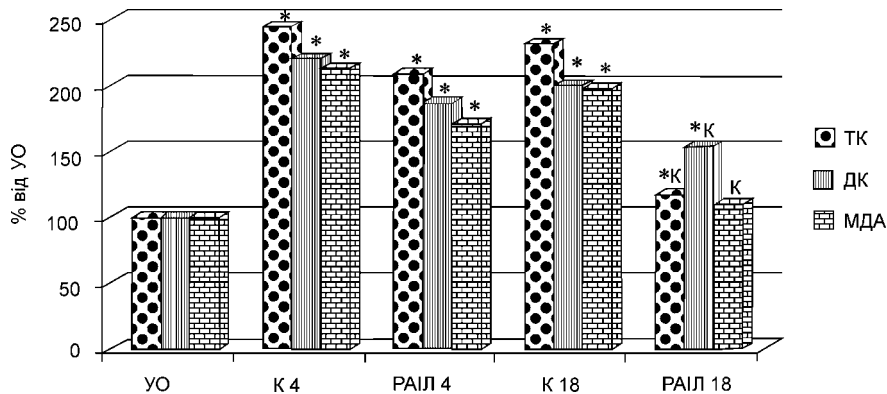


Рис. 2. Показники антиоксидантної системи в мозку щурів після ВМК.

Примітки: УО — група удавано оперованих тварин; К 4 та К 18 — контрольна група на 4 та 18 добу досліді; РАІЛ 4 та РАІЛ 18 — група РАІЛ-1 на 4 та 18 добу досліді. Відхилення вірогідні ( $p < 0,05$ ): \* — відносно УО; <sup>K</sup> — відносно К.

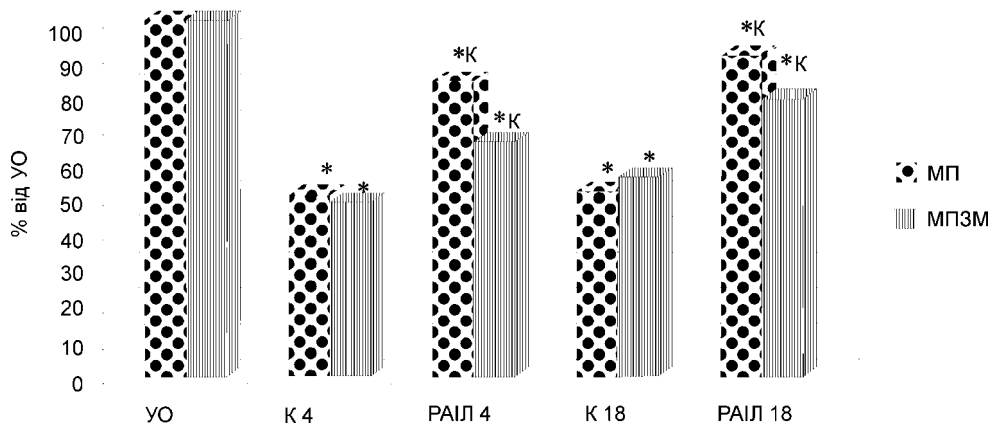


Рис. 3. Відкриття мітохондріальної пори (МП) після ініціації циклоспорином та показник мембранного потенціалу заряду мітохондрій (МПЗМ) у мозку щурів після ВМК.

Примітки: УО — група удавано оперованих тварин; К 4 та К 18 — контрольна група на 4 та 18 добу досліді; РАІЛ 4 та РАІЛ 18 — група РАІЛ-1 на 4 та 18 добу досліді. Відхилення вірогідні ( $p < 0,05$ ): \* — відносно УО; <sup>К</sup> — відносно К.

відновлення показники активності СОД, каталази та ГПР збільшилися відносно контрольної групи відповідно на 77%, 72% і 26% ( $p^{УО} < 0,001$ ,  $p^K < 0,01$ ).

В умовах ішемії/гіпоксії після ВМК активація вільнорадикальних реакцій та ПОЛ призводить до пригнічення активності мітохондріальних ферментів та розвитку мітохондріальної дисфункції. Пригнічення мітохондріального дихання призводить до падіння заряду мітохондрій, що може ініціювати ушкодження внутрішньої мембрани мітохондрій та відкриття неселективної пори (permeability transition pore — РТР) і в подальшому загибель клітини. Відкриття пор відбувається за рахунок окиснення або нітрозилування тіольних груп цистеїн-залежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій, що перетворює його на проникний неспецифічний канал-пору, що приводить до виходу цитохрому С, запуску каспазного каскаду, експресії і виходу в цитозоль проапоптичних білків [6, 9].

В експерименті ми досліджували відкриття мітохондріальних пор (МП) на тлі ініціації циклоспорином (блокатор і специфічний інгібітор  $Ca^{2+}$ -індукованих змін проникності внутрішньої мембрани мітохондрій) та показник потенціалу, що

генерується на внутрішній мітохондріальній мембрані, в присутності сафроніну-О в якості потенціал-залежного зонду (рис. 3).

Утворення неселективної пори мітохондрій визначали за блокуванням відкриття МП та зниженням МПЗП. Ці показники в контрольній групі знизилися на 50-54% в гострому постішемичному періоді ( $p^{УО} < 0,001$ ) та залишилися практично без змін у періоді відновлення ( $p^{УО} < 0,001$ ). Введення тваринам з ВМК РАІЛ-1 стабілізувало деполаризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани — показник МП збільшився до 80% від рівня УО тварин на 4 добу та до 88% на 18 добу ( $p^K < 0,05$ ), МПЗМ зріс відповідно на 64% та 75% ( $p^K < 0,01$ ).

Дисфункція мітохондріального апарату призводить до пригнічення аеробного синтезу енергії, енергозалежних функцій і метаболізму клітин, збільшення проникності мембран та пошкодження їх надлишковими рівнями продуктів ПОЛ, що посилює відкриття пор і вивільнення апоптогенних білків з пошкоджених мітохондрій. В умовах нестачі кисню окиснювальний стрес та енергетичний дефіцит активують строкові регуляторні компенсаторні механізми, індуюють експресію генів раннього реагування та активують механізми па-

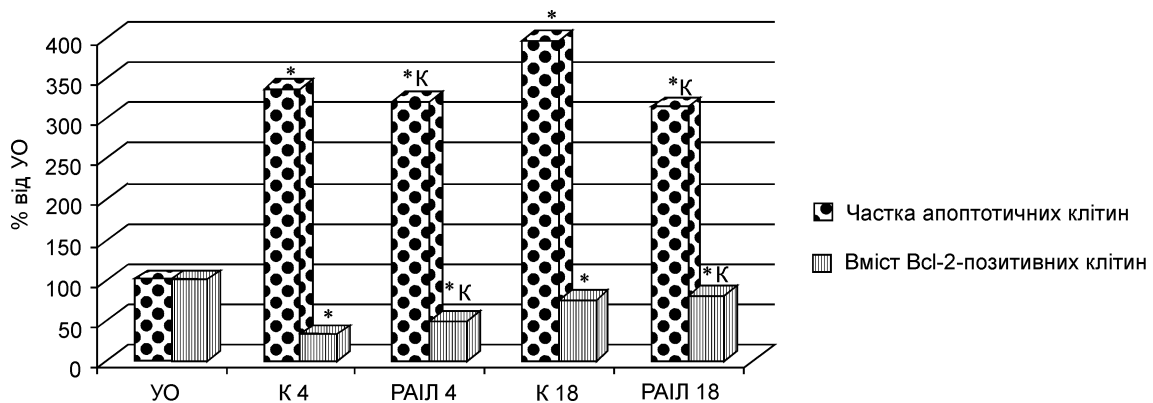


Рис. 4. Частка апоптотичних клітин та вміст c-Fos-позитивних клітин у мозку щурів після ВМК.

Примітки: УО — група удавано оперованих тварин; К 4 та К 18 — контрольна група на 4 та 18 добу досліді; РАІЛ 4 та РАІЛ 18 — група РАІЛ-1 на 4 та 18 добу досліді. Відхилення вірогідні ( $p < 0,05$ ): \* — відносно УО; <sup>К</sup> — відносно К.

тологічної клітинної смерті (некроз) та програмованої загибелі клітин (апоптоз) [1, 10].

У нашому експерименті на 4 добу досліду відзначено значне зростання частки апоптотичних клітин (рис. 4) та зниження рівня білка bcl-2 (bcl-2-позитивних клітин), що відображає перевагу некротичних процесів постішемичної загибелі клітин над процесами апоптозу в гострому періоді ( $p^{YO} < 0,001$ ). В подальшому співвідношення загибелі клітин шляхом некрозу/апоптозу змінилось на користь програмованої загибелі — на 18 добу спостереження зростає частка апоптотичних клітин (до 380% від рівня УО тварин ( $p^{YO} < 0,001$ )) та рівень bcl-2-позитивних клітин ( $p^{YO} < 0,001$ ). При введенні шурам з ВМК РАІЛ-1 відзначено поступову стабілізацію частки апоптотичних клітин та рівнів bcl-2-позитивних клітин з максимальним проявом апоптозомодуючого ефекту в відновлювальному періоді ( $p^{YO} < 0,001$ ,  $p^K < 0,01$ ).

## ВИСНОВКИ

Ступінь системних уражень при ГІ залежить від балансу рівнів ІЛ-1 та його рецепторного антагоніста. Застосування з метою корекції цитокінового дисбалансу РАІЛ-1 в дозі 7,5 мг/кг вірогідно блокує прояви агресивного впливу оксидувального стресу при ВМК — знижує рівні метаболітів ПОЛ на тлі корекції активності антиоксидантної системи, що приводить до стабілізації функціонального стану мембран мітохондрій та оптимізації нейрональних втрат і апоптотичних процесів. Отримані дані свідчать про необхідність подальшого вивчення антиоксидантної активності РАІЛ-1, що дозволить оцінити ефективність його застосування для профілактики і лікування ГІ та інших захворювань внутрішніх органів, пусковою ланкою яких є окиснювальний стрес та активація вільнорадикального ушкодження.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Павлов С.В. и др. // *Международ. неврол. журн.* — 2008. — №4 (20). — С. 23-29.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. *Ишемия головного мозга.* — М.: Медицина, 2001. — 328 с.
3. Скворцова В.И. // *Инсульт.* — 2003. — №9. — С. 20-22.
4. Arend W.P. // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2002. — Vol. 13, №4-5. — P. 323-340.
5. Blum A., Miller H. // *Am. Heart. J.* — 1998. — Vol. 135. — P. 181-186.
6. Dhar-Masareno M., Sacramo J.M. // *Free Radic. Biol. Med.* — 2005. — Vol. 38, №10. — P.1548-1554.
7. Donnan G.A. // *Stroke.* — 2008. — Vol. 39. — P. 242-251.
8. Ferrarese C., Mscarucci P., Zoai C. et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1999. — Vol. 19, №9. — P. 1004-1009.
9. Fridlander R.M., Gardiardini V., Rotello R.J., Yuan H. // *J. Exp. Med.* — 1996. — Vol. 184. — P. 717-724.
10. Kehler J.P. // *Teratol.* — 2000. — Vol. 62. — P. 235-246.
11. Muresanu D.F. *Neurotrophic factors.* — Bucuresti: Libripres, 2003. — P. 35-131.

УДК 615.21:616:831-005.4

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Э.В.Супрун, А.В.Глушенко, А.С.Супрун

На модели экспериментального геморрагического инсульта у крыс (путем введения аутокрови во внутреннюю капсулу головного мозга) на фоне коррекции цитокінового дисбаланса рецепторным антагонистом интерлейкина-1 — РАІЛ-1 в дозе 7,5 мг/кг отмечена стабилизация показателей ПОЛ (ДК, ТК, МДА), активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГПР), а также нормализация функциональной активности митохондрий (МП и МПЗМ), модуляция апоптоза (по доле апоптотических клеток и содержанию bcl-2 положительных клеток).

UDC 615.21:616:831-005.4

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST IN THE EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC STROKE

Ye.V.Suprun, A.V.Glushchenko, O.S.Suprun

Stabilization of indexes of peroxidation of lipids (DK, TK, MDA), activity of antioxidant enzymes (SOD, catalase, GPR), normalization of the functional activity of mitochondria (MP, MPSM), modulation of apoptosis (by the part of apoptotic cells and content of bcl-2 positive cells) have been observed in the model of the hemorrhagic stroke in rats (by introduction of autoblood into internal capsule of the brain) on the background of cytokine disbalance correction with interleukin-1 receptor antagonist — IL-1Ra in the dose of 7.5 mg/kg.