

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И ОКСИДАТИВНОГО СТАТУСА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

¹Левичкин В.Д., ¹Трофименко А.И., ¹Каде А.Х., ¹Павлюченко И.И., ¹Мясникова В.В.,
¹Пирогова Н.П., ¹Занин С.А.

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации», Краснодар, Россия (350063, Краснодар, ул. Седина, 4), e-mail: artemtrofimenko@mail.ru

Целью работы было исследование цитокинового статуса и показателей системы про-/антиоксиданты в динамике острой локальной церебральной ишемии в эксперименте у крыс. Определяли общую антиоксидантную активность, уровень максимальной вспышки хемилюминесценции кров и активность супероксиддисмутазы и каталазы на 1, 3, 7, 14 сутки. Цитокиновый статус оценивали по уровню провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО α). В ходе работы показано значительное превалирование на всех этапах наблюдения прооксидантных факторов над антиоксидантными. Указанные изменения ассоциировались со значительным повышением уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО α) в крови. Таким образом, резкое снижение общей АОА плазмы и стойкое повышение уровня продуктов СРО дает повод говорить о дисбалансе в системе АОЗ крови и организма в целом, что является неблагоприятным фактором течения патологического процесса и требует эффективных мер метаболической коррекции.

Ключевые слова: инсульт, интерлейкин-1, интерлейкин-6, оксидативный стресс.

CHARACTERISTIC OF CYTOKINE PROFILE AND OXIDATIVE STATUS OF RATS WITH EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE

¹Levichkin V.D., ¹Trofimenko A.I., ¹Kade A.H., ¹Pavlyuchenko I.I., ¹Myasnikova V.V.,
¹Pirogova N.P., ¹Zanin S.A.

¹Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, st. Sedina, 4), e-mail: artemtrofimenko@mail.ru

The aim was to study the cytokine status and indicators of pro- / anti-oxidants in the dynamics of local acute cerebral ischemia in rats in the experiment. Determines the total antioxidant activity, the level of the maximum flash chemiluminescence shelter and activity of superoxide dismutase and catalase for 1, 3, 7, 14 days. Cytokine status was evaluated by proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF). The work shows a significant prevalence in all phases of observation prooxidant factors of antioxidant. These changes were associated with a significantly increased level of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF) in the bloodstream. Thus, the sharp decline in the total antioxidant activity of plasma and persistent increase in the level of CPO products gives rise to talk about the imbalance in the blood and the body of AOP in general, which is an unfavorable factor in the pathological process and requires effective measures of metabolic correction.

Keywords: stroke, interleukin-1, interleukin-6, oxidative stress.

Сдвиг равновесия в системе биологического окисления в сторону активации процессов перекисного окисления липидов с одновременным ослаблением резервов антиоксидантной системы защиты организма получил название окислительного, или оксидативного, стресса (ОС) [1]. Каскад патобиохимических реакций запускаемых ОС является одним из ключевых звеньев патогенеза повреждения нервной ткани при самых разных патологических процессах [5]. При значительном повышении содержания продуктов перекисного окисления липидов, эндогенная антиоксидантная система становится неспособной поддерживать баланс системы про-/антиоксиданты, что приводит к развитию ОС одного из универсальных механизмов повреждения тканей [2]. Известно, что при

развитии ишемического инсульта (ИИ) существует прямая зависимость между изменением содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-6), активностью процессов свободнорадикального окисления и конечными размерами инфаркта мозга [6].

В связи с вышеизложенным целью исследования является изучение взаимосвязи содержания провоспалительных цитокинов с характером сдвигов в системе про-/антиоксиданты у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом.

Материалы и методы. Исследования проведены в лабораториях кафедры общей и клинической патофизиологии и кафедры фундаментальной и клинической биохимии ГБОУ ВПО КубГМУ. Иммуноферментные исследования (ИФА) проводили на базе ЦНИЛ ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. Эксперименты проведены на 60 белых нелинейных самцах крыс, средней массой - 200 ± 25 гр. Содержание животных и постановка экспериментов проводилась в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 года и № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 года, а также международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

Крысы были разделены на 2 группы: 1 группа – из 20 крыс, контрольная, интактные животные; 2 группа – из 40 крыс, у которых проводилось моделирование экспериментального ишемического инсульта с эвтаназией на 1, 3, 7 и 14 сутки [3]. Все потенциально болезненные вмешательства в проводимых экспериментах, а также эвтаназия осуществлялись под комбинированным инъекционным наркозом [4]. Выделение головного мозга проводили с последующей фиксацией в 10% нейтральном формалине. Для изучения показателей системы прооксиданты-антиоксиданты и уровня провоспалительных цитокинов крысы из группы №2 ($n=40$) на 1, 3, 7 и 14 выводились из эксперимента по 10 животных, с одномоментным забором крови. В плазме крови определяли уровень ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α методом иммуноферментного анализа (ИФА). Учет реакции, построение калибровочных графиков и определение концентрации показателей проводили на фотометре вертикального сканирования «ANTHOS 2010» (Австрия) с помощью программного обеспечения «Auswertesoftware anthos labtec», версия 2.3.0.7. В эритроцитарной массе изучалась активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) крови – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Активность СОД определяли в гемолизате эритроцитов по методу предложенному В.А. Костюк и соавт. (1990) в авторской модификации И.И. Павлюченко и соавт. (2006) [4, 5, 7], которая основана на способности СОД ингибировать индуцированную реакцию аутоокисления кверцетина. Активность КАТ исследовали в гемолизате эритроцитов по методу R. Veers et al., (1952) в авторской модификации И.И. Павлюченко и соавт. (2006) [4, 5, 7], основанному на оценке скорости убыли субстрата фермента (перекиси водорода). В

плазме крови биофизическими методами изучались общая антиоксидантная активность (АОА) и уровень максимальной вспышки хемилюминесценции (МВХЛ).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами непараметрической статистики с использованием программного обеспечения «Statistika 6.0 for Windows» фирмы «Stat Soft Inc.». Полученные результаты выражали в виде средних значений (M) и ошибки среднего (m).

Сравнение выборок проводилось по непараметрическому критерию Манна-Уитни, с установлением уровня значимости $*p \leq 0,05$. Величины средних значений в таблицах указаны в границах $M \pm m$.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучения показателей системы про-/антиоксиданты были выявлены существенные сдвиги в системе АОЗ крови уже на 1 сутки (табл.1).

Таблица 1

Показатели системы про-/антиоксиданты у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом

Показатель/группа крыс	Модель ИИ								Интактные животные (контроль)	
	1 сутки		3 сутки		7 сутки		14 сутки			
М ± m	M	m	M	m	M	M	M	m	M	m
¹ АОА, нА*с	2151,3	39,8	2931,1	47,8	2818,2	87,4	1214,5	19,7	1441,9	35,26
² МВХЛ, у.е. ХЛ	0,327	0,025	0,532	0,035	0,887	0,023	0,648	0,045	0,137	0,06
³ КАТ, ед. акт.	1,28	0,03	0,87	0,03	1,22	0,07	1,33	0,05	1,79	0,1
⁴ СОД, ед. акт.	0,18	0,01	0,21	0,01	0,33	0,03	0,16	0,01	0,13	0,06

¹АОА- антиоксидантная активность; ²МВХЛ- максимальная вспышка хемилюминесценции; ³КАТ- каталаза; ⁴СОД- супероксиддисмутаза.

АОА плазмы крови во 2 группе животных на 1 сутки моделирования ИИ достоверно ($p \leq 0,05$) возросла в среднем на 49,2% относительно показателей контрольной группы животных, что отражает напряжение в системе АОЗ в ответ на ОС при экспериментальном ишемическом инсульте (табл. 1).

На выраженность оксидативной нагрузки указывает показатель ХЛ, отражающий накопление продуктов свободно-радикального окисления (СРО) в биологических жидкостях и тканях организма.

Уровень ХЛ на 1 сутки после моделирования ИИ в группе 2 был достоверно ($p \leq 0,05$) выше значений контрольной группы животных на 138,9% (табл. 2).

Таблица 2

**Динамика уровня ИЛ-1 β у крыс с экспериментальным
ишемическим инсультом**

Показатель	Контроль	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки
ИЛ-1β М	30,93	464,60	1798,99	623,08	407,73
$\pm m$	7,90	127,43	586,25	56,97	125,34
p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p*			<0,05	<0,05	>0,05
p**				<0,05	<0,05
p***					<0,05

Примечание: ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β ; p - достоверность различия по отношению исходному показателю; p*- достоверность различия по отношению показателя 1 суток после моделирования ишемического инсульта; p** - достоверность различия по отношению показателя 3 суток после моделирования ишемического инсульта; p*** - достоверность различия по отношению показателя 7 суток после моделирования ишемического инсульта.

При изучении активности СОД и КАТ в крови подтвердилось наличие значительного дисбаланса в системе АОЗ организма при развитии ИИ. Активность СОД при моделировании ИИ уже на 1 сутки эксперимента достоверно ($p \leq 0,05$) возросла во 2 группе, относительно группы контроля, на 38,5% (табл. 1). В 1 сутки, после моделирования ИИ, активность КАТ была достоверно ($p \leq 0,05$) ниже контрольных значений у животных 2 группы на 28,5% (табл. 1). У крыс группы 2 на 1 сутки после моделирования ИИ содержание ИЛ-1 β в плазме крови достоверно ($p \leq 0,05$) выросло на 93,34% по сравнению с интактными животными группы (табл. 2). В 1 сутки после моделирования ИИ содержание ФНО- α в плазме крови животных группы 2 составило $17,82 \pm 6,31$ пг/мл, что было достоверно ($p \leq 0,05$) больше на 52,80 %, чем в плазме крови интактных животных (табл. 3).

Таблица 3

**Динамика уровня ФНО- α у крыс с экспериментальным
ишемическим инсультом**

Показатель	Контроль	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки
ФНО-α М	8,41	17,82	18,36	17,82	21,01
$\pm m$	2,53	6,31	7,20	3,79	8,06
p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p*			>0,05	>0,05	>0,05
p**				>0,05	>0,05
p***					>0,05

Примечание: ФНО- α – фактор некроза опухоли- α ; p - достоверность различия по отношению исходному показателю; p*- достоверность различия по отношению показателя 1 суток после моделирования ишемического инсульта; p** - достоверность различия по отношению показателя 3 суток после моделирования ишемического инсульта; p*** - достоверность различия по отношению показателя 7 суток после моделирования ишемического инсульта.

У животных группы 2 уровень ИЛ-6 в 1 сутки достоверно ($<0,05$) повышался на 111,9% (табл. 4).

Таблица 4

**Динамика уровня ИЛ-6 у животных с экспериментальным
ишемическим инсультом**

Показатель	Контроль	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки
ИЛ-6 М	0,43	6,87	10,37	11,52	10,20
±m	0,16	1,93	1,91	2,73	2,83
p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p*			<0,05	<0,05	<0,05
p**				>0,05	>0,05
p***					>0,05

Примечание: ИЛ-6 – интерлейкин-6; p - достоверность различия по отношению исходному показателю; p*- достоверность различия по отношению показателя 1 суток после моделирования ишемического инсульта; p** - достоверность различия по отношению показателя 3 суток после моделирования ишемического инсульта; p*** - достоверность различия по отношению показателя 7 суток после моделирования ишемического инсульта.

На 3 сутки у животных 2 группы показатель АОА был достоверно ($p \leq 0,05$) выше контрольных значений в среднем на 103,3% и такое повышение данного биофизического показателя сохранялось вплоть до 7 суток (табл. 1).

Интенсивность прооксидантной нагрузки на 3 сутки достоверно ($p \leq 0,05$) возрастала. Показатель МХВЛ плазмы крови в этот период во 2 группе был достоверно ($p \leq 0,05$) выше показателя контроля на 288,3% (табл. 1).

На 3 сутки показатель активности СОД достоверно ($p \leq 0,05$) увеличивался во 2 группе, относительно контрольных значений на 61,5% (табл. 1).

Активность КАТ была достоверно ($p \leq 0,05$) ниже контрольных значений у животных 2 группы на 3 сутки - на 51,4% (табл. 1).

Эти сдвиги свидетельствуют о максимальном напряжении системы АОЗ в этот период у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом.

К 3 суткам уровень ИЛ-1 β достоверно ($p \leq 0,05$) увеличился еще на 74,17% (табл. 2).

Значительное стойкое повышение уровня ИЛ-6 имело место в дальнейшем в течение всего периода наблюдения (табл. 2).

Уровень ФНО- α после моделирования ИИ у животных группы 2 оставался достоверно ($p \leq 0,05$) повышенным без существенной динамики от 3 до 14 суток, что может объяснить большую активность процессов свободно-радикального окисления у крыс с данной моделью патологии [10, 12-14] (табл. 3).

У животных группы 2 уровень ИЛ-6 достоверно ($p \leq 0,05$) достигал максимума к 3 суткам, повышаясь на 50,9% по сравнению с 1 сутками.

Повышение АОА, наблюдаемое на 3 сутки, сохранялось вплоть до 7 суток (табл. 1).

На 7 сутки отмечен максимальный подъем уровня продуктов СРО в плазме крови экспериментальных животных, что выразилось в достоверном ($p \leq 0,05$) повышении показателя МХВЛ во 2 группе животных на 166,7% по сравнению с 3 сутками (табл. 1).

Происходило дальнейшее возрастание напряжения в системе АОЗ. На 7 сутки показатель активности СОД достоверно ($p \leq 0,05$) увеличивался во 2 группе животных, относительно контрольных значений, на 153,8% (табл. 1).

На 7 сутки после моделирования ИИ содержание ИЛ-1 β достоверно ($p \leq 0,05$) снизилось на 65,36% по сравнению с 3 сутками (табл. 2).

На 7 сутки после моделирования ИИ содержание ФНО- α в плазме крови животных группы 2 оставалось достоверно ($p \leq 0,05$) больше на 52,8%, чем в плазме крови интактных животных (табл. 3).

ИЛ-6 был достоверно ($p \leq 0,05$) стойко повышен в течение всего периода наблюдения (табл. 4).

На 14 сутки наблюдения отмечено резкое снижение АОА плазмы крови, при этом во 2 группе происходил обвал этого показателя ниже контрольных значений на 16% ($p \leq 0,05$) (табл. 1). Данная динамика показателей АОА плазмы крови у животных с экспериментальным ишемическим инсультом свидетельствует о выраженном ОС, который прогрессировал во времени.

К 14 суткам отмечено достоверное ($p \leq 0,05$) снижение уровня МХВЛ плазмы крови относительно 7 суток, но уровень этого показателя прооксидантной нагрузки оставался высоким и в этот период. Он достоверно ($p \leq 0,05$) превышал уровень, отмеченный во 2 группе в 1 сутки на 107,9% (табл. 1) Данный факт является подтверждением выраженных метаболических сдвигов в организме при возникновении ишемических катастроф в мозговых тканях.

На 14 сутки после моделирования ИИ уровень ИЛ-1 β в плазме крови животных группы 2 вернулся к уровню 1 суток. Однако оставался достоверно ($p \leq 0,05$) выше на 93,34 % по сравнению с интактными животными (табл. 1). Уровни ФНО- α и ИЛ-6 оставались повышенными также и на 7 сутки (табл. 3, 4).

Таким образом, резкое снижение общей АОА плазмы и стойкое повышение уровня продуктов СРО дает повод говорить о дисбалансе в системе АОЗ крови и организма в целом, что является неблагоприятным фактором течения патологического процесса и требует эффективных мер метаболической коррекции. Дисбаланс в системе АОЗ клеток подтверждается и динамикой изменения активности ферментов антирадикальной и антиоксидантной защиты. Кроме того, есть проблема избыточного образования активных метаболитов кислорода при участии компонентов АОС, в частности, пероксида водорода,

который может синтезироваться в повышенных количествах на фоне высокой активности СОД и низкой активности КАТ, что и наблюдалось у экспериментальных животных.

Развитие экспериментального ишемического инсульта сопровождалось одновременным значительным ростом содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) в периферической крови. Синтез ИЛ-1 микроглией в ответ на развитие церебральной ишемии является активирующим сигналом для запуска образования других провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ФНО- α), а также стимуляции астроцитов к продукции потенциальных нейротоксичных веществ, провоспалительные цитокины, АФК и метаболиты арахидоновой кислоты [6]. ФНО- α оказывает токсическое действие на нейроны путем активации системы генерации активных форм кислорода (АФК), что резко индуцирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), в том числе, за счет взаимодействия с сигнальной системой сфингомиелинового цикла [6].

ИЛ-1 и ФНО- α являются мощными индукторами ИЛ-6-синтетазы в астроцитах: быстрое увеличение содержания микроглиального ИЛ-1 β в первые 1-2 ч церебральной ишемии вызывает усиленный синтез ИЛ-6 [6].

Список литературы

1. Луговая И.А. Активность ферментов антирадикальной защиты в эритроцитах и в раневом отделяемом у больных с осложненным течением сахарного диабета / И.А. Луговая, И.И. Павлюченко, С.Р. Федосов // Открытое образование. – 2006. – № 3. – С. 425–427.
2. Луцак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него // Биохимия.— 2001.— Т. 66, вып. 5.— С. 592–609.
3. Трофименко А.И. Моделирование церебральной ишемии посредством коагуляции средней мозговой артерии у крыс / А. И. Трофименко, А. Х. Каде, В. П. Лебедев [и соавт.] // Фундаментальные исследования. - №2. – 2012. – с. 215-218.
4. Трофименко А.И. Характеристика сдвигов в системе про-/антиоксиданты у крыс с моделью острой локальной церебральной ишемии / А.И. Трофименко, В.Д. Левичкин, И.И. Павлюченко, А. Х. Каде, О. С. Охременко, С. А. Занин // Фундаментальные исследования. – 2013. - № 9 (ч.4). – С. 683-686.
5. Трофименко А.И. Активность свободно-радикального окисления и эндорфинергической системы у крыс с моделью острой локальной церебральной ишемии / А. И. Трофименко, В. Д. Левичкин, И. И. Павлюченко, А. Х. Каде, О. С. Охременко, Ф. А. Нехай, С. А. Занин // Современные наукоемкие технологии. - 2014. - № 4. - С. 126-127.

6. Трофименко А.И. Динамика цитокинового статуса у крыс при моделировании ишемического инсульта / А.И. Трофименко, А.Х. Каде, В.Д. Левичкин [и соавт.] // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 2. - С. 326.

7. Трофименко А.И. Про-/антиоксидантная активность плазмы крови у крыс с моделью острой локальной церебральной ишемии / А.И. Трофименко, В.Д. Левичкин, И.И. Павлюченко [и др.] // Современные наукоемкие технологии. - 2014. - № 4. – С. 142-143.

Рецензенты:

Колесникова Н.В., д.б.н., профессор, заведующая ЦНИЛ Отдела клинической экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар;

Абушкевич В.Г., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России» г. Краснодар.