

β-ЭНДОРФИН И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Трофименко А.И., Каде А.Х., Мясникова В. В., Пирогова Н.П., Занин С.А.

ГБОУ ВПО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Краснодар, Россия (350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4) zanin77@mail.ru

В основе развития синдрома системного воспалительного ответа при неинфекционной патологии лежит значительный рост концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α) в системной циркуляции, развивающийся при повреждении тканей. Во многом его возникновение обусловлено нарушением регуляторных механизмов контролирующего развитие воспаления, центральное место среди которых занимает эндогенная опиоидергическая система. При моделировании ишемического инсульта у крыс путем коагуляции ПСМА нарушение кровотока приводит к развитию инфаркта мозга, который локализуется преимущественно в неокортексе и захватывает небольшую область каудопутамона. На 3 сутки имеет место прирост его объема на 18,3%. Моделирование ишемического инсульта сопровождается значительным ростом содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α) в периферической крови. Это явление сопровождается прогрессирующим снижением уровня β-эндорфина, что указывает на депрессию эндогенной опиоидергической стресс-лимитирующей системы при экспериментальном ишемическом инсульте.

Ключевые слова: инсульт, β-эндорфин, оксидативный стресс.

β-ENDORPHIN AND CYTOKINE PROFILE IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL IS ISCHEMIC STROKE

Trofimenko A.I., Kade A.H., Myasnikova V.V., Pirogova N.P., Zanin S.A.

Kuban state medical university of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, Sedina street, 4), zanin77@mail.ru

At the heart of the development of systemic inflammatory response syndrome with non-infectious disease is a significant increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) in the systemic circulation, the developing tissue injury. In many ways, his appearance due to a violation of regulatory mechanisms controlling the development of inflammation, central among which is endogenous opioidergic system. In the simulation of ischemic stroke in rats by coagulation PSMA blood flow disturbance leads to the development of cerebral infarction, which is localized mainly in the neocortex and captures a small region kaudoputamena. On day 3 there is an increase in its volume by 18.3%. Simulation ischemic stroke accompanied by significant pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) in the peripheral blood. This phenomenon is accompanied by a progressive decrease in the level of β-endorphins, which indicates depression of endogenous opioidergic stress-limiting system in experimental ischemic stroke.

Keywords: stroke, β-endorphin, oxidative stress.

Синдром системного воспалительного ответа (ССВО) – воспалительный ответ на уровне целостного организма, в основе его развития при неинфекционной патологии лежит значительный рост концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α) в системной циркуляции, происходящий при повреждении тканей [1]. При этом практически отсутствуют исследования посвященные комплексной оценке показателей опиоидергической системы и уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО-α, ИЛ-6) в динамике экспериментального ИИ у крыс. Учитывая вышесказанное целью работы была комплексная оценка динамики (на 1, 3, 7 и 14 сутки) содержания β-эндорфина, провоспалительных

цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) и размеров очага инфаркта мозга у крыс с экспериментальным ИИ.

Материалы и методы. Исследование выполнено в лаборатории кафедры общей и клинической патофизиологии КубГМУ. Иммуноферментные исследования (ИФА) проводились на базе ЦНИЛ ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. Эксперименты проведены на 60 белых нелинейных самцах крыс средней массой - 200 \pm 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».

Животные были разделены на 2 группы:

- 1 группа (n=20) – контрольная – интактные животные подвергались эвтаназии без оперативного вмешательства.
- 2 группа (n=40) – животные с моделированием ИИ. Выведение животных из эксперимента производили по 10 животных на 1, 3, 7 и 14 сутки после моделирования ИИ.

Все потенциально болезненные вмешательства в проводимых экспериментах, а также эвтаназия осуществлялись под комбинированным инъекционным наркозом: золетил 0,3 мг в/м («Virbac» Франция), ксиланит 0,8 мг в/м (ЗАО «НИТА-ФАРМ, Россия, г. Саратов), атропина сульфат 0,1% раствор - 0.01 мл п/к из расчета на 100 гр. массы тела животного [3, 4].

Моделирование ИИ осуществляли путем создания у крыс острой локальной церебральной ишемии путем коагуляции правой средней мозговой артерии (ПСМА) [3]. Эвтаназию крыс выполняли с соблюдением правил проведения работ при использовании экспериментальных животных, путем декапитации под стандартным наркозом. Непосредственно перед эвтаназией проводили забор крови путем венесекции общей яремной вены у крыс. После наступления летального исхода для последующего гистологического исследования производили изъятие ГМ.

Определение уровня β -эндорфина в плазме крови количественно проводили иммуноферментным методом с помощью набора «Elabscience Biotechnology Co., Ltd», (Китай). Определение уровня ИЛ-1 β в плазме крови проводили иммуноферментным методом с помощью набора «Ray Biotech, Inc.» (Германия). Определение уровня ИЛ-6 в плазме крови проводили иммуноферментным методом с помощью набора «Cusabio Biotech Co., Ltd» (Китай). Определение уровня ФНО- α в плазме крови проводили иммуноферментным методом с помощью набора «Ray Biotech, Inc.», (Германия). Учет реакции, построение калибровочных графиков и определение концентрации показателей проводили на фотометре

вертикального сканирования «ANTHOS 2010» (Австрия) с помощью программного обеспечения «Auswerte-Software anthos labtec», версия 2.3.0.7.

ГМ подвергался двукратной промывке в охлажденном растворе 0,9% хлорида натрия, с последующей его заморозкой и хранением при -35°C . Размер очага церебральной ишемии определяли тетразолиевым методом на макросрезках [5].

Показатель «удельный объем инфаркта мозга» определяли как соотношение объема очага инфаркта мозга к объему всего мозга.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами непараметрической статистики с использованием программного обеспечения «Statistika 6.0 for Windows» фирмы «Stat Soft Inc.». Полученные результаты исследуемых групп после статистической обработки 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 ИИ происходит переход воспалительного ответа на системный уровень, что проявлялось в виде развития синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [1].

Главная роль в развитии патологических изменений при развитии ССВО отводится провоспалительным цитокинам (ИЛ- 1β , ИЛ-6, ФНО- α) [1].

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 [1].

У крыс группы 2 на 1 сутки после моделирования ИИ содержание ИЛ- 1β в плазме крови достоверно ($p \leq 0,05$) выросло на 93,34% по сравнению с интактными животными группы №1. К 3 суткам уровень ИЛ- 1β достоверно ($p \leq 0,05$) увеличился еще на 74,17% (табл. 1). На 7 сутки после моделирования ИИ содержание ИЛ- 1β достоверно ($p \leq 0,05$) снизилось на 65,36% по сравнению с 3 сутками.

На 14 сутки после моделирования ИИ уровень ИЛ- 1β 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).

Динамика уровня ИЛ- 1β у животных с экспериментальным ишемическим инсультом

Таблица 1

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.

ИЛ-6 синтезируется многими типами клеток, обеспечивающими запуск и регуляцию воспаления и иммунного ответа. ИЛ-6 активирует экспрессию молекул адгезии и хемотаксис лейкоцитов, а также является важнейшим индуктором острофазного ответа [1].

Показано, что 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 [1].

У животных группы 2 уровень ИЛ-6 повышался в 1 сутки и достигал максимума к 3 суткам. В дальнейшем имело место стойкое значительное повышение уровня ИЛ-6 в течение всего периода наблюдения (табл. 2).

Таблица 2

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
$\pm m$	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.

ФНО- α оказывает токсическое действие на нейроны путем активации системы генерации активных форм кислорода (АФК), что резко индуцирует процессы перекисного окисления липидов, в том числе, за счет взаимодействия с сигнальной системой сфингомиелинового цикла [2]. ФНО- α помимо токсического влияния, в низкой (физиологической) концентрации, оказывает защитный эффект на нейроны, путем увеличения экспрессии факторов антиоксидантной системы [2]. ФНО- α наряду с ИЛ-1 β и

ИЛ-6 является ключевыми медиатором микроглиальных нейроиммунных функций [1]. Таким образом, изменение его содержания влияет на степень повреждения ткани мозга. После моделирования ИИ уровень ФНО- α у животных группы №2 возрастал и оставался достоверно ($p \leq 0,05$) повышенным (более чем на 50%) без существенной динамики с 1 до 14 суток, что объясняет большую активность процессов свободно-радикального окисления у крыс с данной моделью патологии [6-9] (табл. 3).

Таблица 3

Динамика уровня ФНО- α у животных 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.

β -эндорфин важнейший представитель семейства ОП является агонистом μ и δ классических ОР [10]. Имеются данные свидетельствующие о нейропротекторном, противовоспалительном, антиоксидантном, нейротрофическом, антигипоксическом эффектах активации δ -опиоидных рецепторов [10].

Содержание β -эндорфина в плазме крови интактных животных составило $27,52 \pm 6,14$ пг/мл (табл. 4).

Таблица 4

Содержание β -эндорфина у животных с экспериментальным ишемическим инсультом

Показатель	Контроль	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки
β -эндорфин, М	27,51	13,95	11,10	9,63	9,62
$\pm m$	6,13	1,88	1,33	2,65	3,02
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: 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.

В плазме крови животных из группы 2 на 1 сутки после моделирования ИИ уровень β -эндорфина составил $13,95 \pm 1,88$ пг/мл, что достоверно ($p \leq 0,05$) меньше на 49,31 %, чем в

плазме крови животных группы 1 (табл. 4). К 3 суткам после моделирования ИИ в плазме крови животных группы 2 уровень β -эндорфина по сравнению с 1 сутками стал достоверно ($p \leq 0,05$) меньше на 20,35% и составил $11,11 \pm 1,33$ пг/мл. Это достоверно ($p \leq 0,05$) меньше на 59,62%, чем в плазме крови животных группы №1 (табл. 4).

На 7 сутки после моделирования ИИ в плазме крови животных группы 2 содержание β -эндорфина по сравнению с 1 сутками стало достоверно ($p \leq 0,05$) меньше на 30,89%. По сравнению с 3 сутками содержание β -эндорфина достоверно ($p \geq 0,05$) не изменилось и составило $9,64 \pm 2,66$ пг/мл, что достоверно ($p \leq 0,05$) меньше на 64,97%, чем в плазме крови животных группы 1 (табл. 4).

К 14 суткам после моделирования ИИ в плазме крови животных группы 2 уровень β -эндорфина по сравнению с 3 и 7 сутками достоверно ($p \geq 0,05$) не изменился. По сравнению с 1 сутками он остался достоверно ($p \leq 0,05$) меньше на 30,96% и составил $9,63 \pm 3,02$ пг/мл (табл. 4).

Итак, моделирование ИИ вызывало падение уровня β -эндорфина на 1 сутки. К 3 суткам содержания β -эндорфина достигало минимума и оставалось на этом уровне на 7 и 14 сутки.

Для оценки динамики объема очага инфаркта определяли показатель «удельный объем инфаркта мозга» путем подсчета соотношения объема очага инфаркта мозга к объему всего мозга.

На срезах мозга животных группы 2, сделанных на 1 и 3 сутки, четко выявлялась область инфаркта мозга, локализованная в зоне кровоснабжения ПСМА с захватом неокортекса и небольшого участка каудопутамена. Удельный объем очага инфаркта мозга у крыс группы 2 на 1 сутки составил $0,108 \pm 0,003$ у.е. На 3 сутки он достоверно ($p \leq 0,05$) возрастал на 18,3% и составлял $0,132 \pm 0,010$ у.е.

Выводы. При моделировании ишемического инсульта у крыс путем коагуляции ПСМА нарушение кровотока приводит к развитию инфаркта мозга, который локализуется преимущественно в неокортексе и захватывает небольшую область каудопутамена. На 3 сутки имеет место прирост его объема на 18,3%.

Моделирование ишемического инсульта сопровождается значительным ростом содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) в периферической крови. Это явление сопровождается прогрессирующим снижением уровня β -эндорфина, что указывает на депрессию эндогенной опиоидергической стресс-лимитирующей системы при экспериментальном ишемическом инсульте.

Список литературы

1. Белоцкий, С.М., Авталион, Р.Р. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. – М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 240 с.
2. Меньшикова Е.Б. Окислительный и стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков [и соавт.] // Новосибирск, 2008, 284 с.
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. Особенности электрокардиограммы у крыс с моделью церебральной ишемии, вызванной посредством коагуляции правой средней мозговой артерии / А.И. Трофименко, А.Х. Каде, В.П. Лебедев [и соавт.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2012. - № 2. – С. 175-179.
5. Трофименко А.И. Визуализация очага ишемии головного мозга у крысы тетразолиевым методом / А.И. Трофименко, А.Х. Каде, С.А. Занин, В.Д. Левичкин, А.Ю. Туровая, С.П. Вчерашнюк // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2013. - № 5. - С. 99.
6. 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.
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 соавт.] // Современные наукоемкие технологии. - 2014. - № 4. – С. 142-143.
8. Трофименко А.И. Влияние ТЭС-терапии на показатели системы про/антиоксиданты у крыс с экспериментальным ишемическим инсультом / А. И. Трофименко, В. Д. Левичкин, Е. И. Ременякина, И. И. Павлюченко, А. Х. Каде, С. А. Занин // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 2. – С. 332.
9. 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.
10. Трофименко А.И. Динамика уровня β -эндорфина при моделировании ишемического инсульта у крыс / А.И. Трофименко, А.Х. Каде, Ф.А. Нехай, В.П. Лебедев, В.Д. Левичкин, С.А. Занин // Кубанский научный медицинский вестник. - 2014. - № 3. - С.115-118.

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.