

УДК 577.125

©Коллектив авторов

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ОБМЕН ГАНГЛИОЗИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ МОЗГА

*А.В. Закарян, Г.С. Казарян, Г.В. Закарян, М.М. Мелконян, Л.М. Овсепян**

Институт молекулярной биологии, НАН РА, Армения, 0014 Ереван,
ул. Асратяна, 7; тел.: (37410) 243 609; факс: (37410) 282 061;
эл. почта: lhovs@yahoo.com

Изучен цитокиновый профиль в крови, а также содержание продуктов перекисного окисления липидов и количество ганглиозидов в головном мозге крыс с экспериментальным отёком мозга. Обнаружено увеличение содержания провоспалительных и уменьшение противовоспалительных цитокинов при развитии отека мозга. Параллельно наблюдалось накопление продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов, гидроперекисей и малонового диальдегида). Исследование содержания ганглиозидов позволило обнаружить уменьшение содержания и увеличение продукта их гидролитического распада - сфингозина - при экспериментально вызванном отёке мозга.

Ключевые слова: отек мозга, цитокины, ганглиозиды, сфингозин

ВВЕДЕНИЕ. Проблема отека-набухания головного мозга представляет одну из наиболее важных проблем современной медицины. Отёк мозга (ОМ) возникает в результате травматических нарушений (черепно-мозговая травма), гипоксических воздействий, интоксикациях, патогенных влияний опухолей и их метастазов. С ОМ сталкиваются при проведении реанимационных мероприятий, а также у больных, страдающих различными формами кровоизлияния в мозг. Литературные данные свидетельствуют о вовлечении нейроглии при поражении головного мозга отёком, приводящим к гипергидратации астроцитов [1]. При воспалительных процессах происходит патологическая активация глиальных клеток, при которой они трансформируются в иммунокомпетентные клетки, продуцируя цитокины и другие сигнальные молекулы [2, 3]. Среди цитокинов различают противовоспалительные (ИЛ-10, ИЛ-4) и провоспалительные (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, фактор некроза опухоли (ФНО α), и др.) [4] Литературные данные свидетельствуют о том, что провоспалительные цитокины способствуют образованию свободных радикалов в мозге, что является одним из ключевых моментов в проявлении цитотоксического действия цитокинов, и играет значительную роль в развитии апоптоза клеток мозга [5]. Действие цитокинов на клетку осуществляется через активацию рецепторов, осуществляющих передачу сигнала внутрь клетки. Активация и образование некоторых цитокинов требует активации протеинкиназы С, что может регулироваться гликолипидами [6]. Гликолипиды, являясь частью рецепторных комплексов, участвуют в иммунном ответе как антигены иммунокомпетентных клеток, а также могут осуществлять передачу информации между разными типами иммунокомпетентных клеток, служить модуляторами иммунного ответа.

* - адресат для переписки

ЦИТОКИНЫ И ГАНГЛИОЗИДЫ ПРИ ОТЕКЕ МОЗГА

Большое количество литературных данных свидетельствует об участии кислых гликолипидов - ганглиозидов (ГЗ) в иммунологических процессах; с ними связаны процессы трансмембранного переноса, межклеточных взаимодействий, активация и экспрессия лимфоцитов [7].

Целью настоящего исследования было исследование взаимосвязи между концентрациями про- и противовоспалительных цитокинов, процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), количества ганглиозидов и продукта их гидролитического распада - сфингозина в норме и при экспериментально вызванном ОМ.

МЕТОДИКА. Исследование проводили на беспородных белых крысах массой 170-200 г. Токсический отёк головного мозга вызывали внутрибрюшинным введением тетраэтилолова в дозе 10 мг на 1 кг массы животного. Критерием развития отека мозга служили выраженная гидратация мозговой ткани и показатели микроскопического исследования [8]. О содержании воды судили по сухому остатку ткани мозга после высушивания при 110°C до постоянной массы.

Определение концентраций ФНО α и провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6) и противовоспалительных (TGF- β , ИЛ-10) проводили с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) Для определения цитокинов использовали коммерческие иммуноферментные наборы "Sigma" (США). Интенсивность реакции оценивали с помощью ELISA-ридера [9].

Выделение нейроглии проводили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы 1,0 М и 1,75 М, которое проводили в течении 30 мин при 60000 g в рефрижераторной центрифуге VAC-60, используя ротор Swout 3 \times 50. Нейроглиальные клетки располагаются на слое 1,75 М сахарозы [10].

Об интенсивности ПОЛ судили по количеству образования диеновых конъюгатов (ДК), гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА). Содержание ДК оценивали по характерному для них поглощению при 233 нм [11]. ГП определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [12]. МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [13]. Количество белка определяли по методу Лоури [14].

Ганглиозиды определяли методом тонкослойной хроматографии (пластины компании "Merck", Германия) в системе растворителей хлороформ : метанол : 2,5 М аммиак (60:35:8). О содержании ГЗ судили по количеству N-ацетилнейраминовой кислоты [15].

Количественное содержание сфингозина исследовали после гидролитического расщепления общей фракции ГЗ головного мозга, которое проводили в смеси конц. HCl : вода : метанол (8,6:9,4:82) в течении 18 ч. при 80°C. Сфингозин экстрагировали этилацетатом, окрашенный комплекс с метилоранжем фотометрировали на СФ при длине волны 415 нм [16]. Статистическую значимость результатов оценивали методом Стьюдента, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При отеке мозга наблюдается увеличение концентрации ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-1 β в крови (рис. 1). ФНО α и ИЛ-1 β в низких концентрациях играют важную роль в регуляции иммунного ответа и тканевого гомеостаза, в высоких концентрациях оказывают патологическое эндокриноподобное действие, вызывая микрососудистую гиперкоагуляцию и гемодинамические нарушения. Предполагают, что ФНО α является ключевым медиатором микроглиальных нейроиммунных функций, оказывает повреждающее воздействие на миелин и олигодендроциты и вырабатывается локально в ответ на ишемизацию головного мозга [17]. Присоединение молекулы цитокина к специфическому рецептору (p-55 и p-75) запускает ряд сигнальных путей: активацию каскада протеинкиназ, активацию транскрипционного фактора NF- κ B, экспрессию NO-синтазы и генерацию NO, а также активацию фосфолипаз C, A $_2$ и сфингомиелиназы [5, 18].

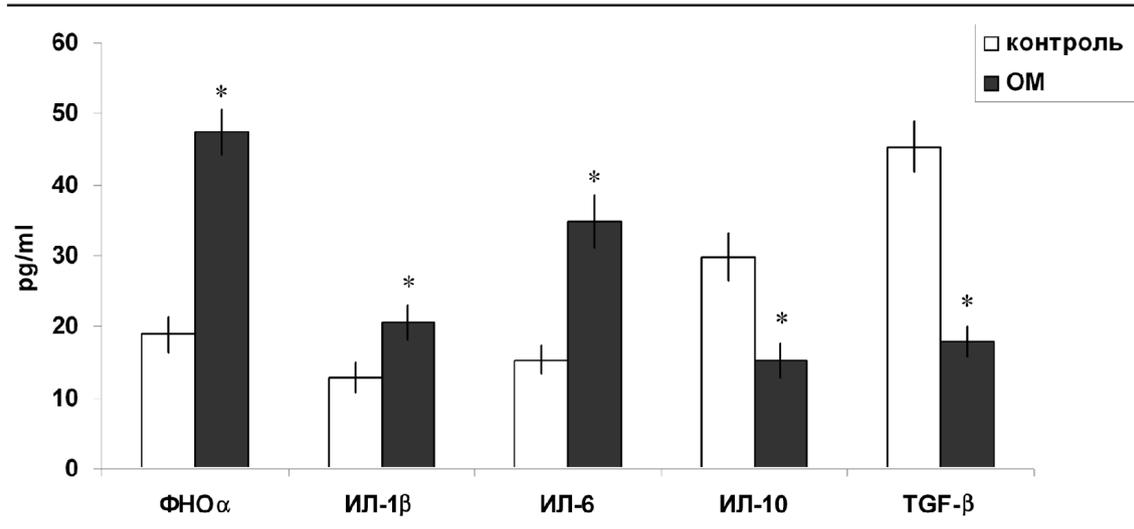


Рисунок 1.

Содержание цитокинов в крови при экспериментальном отеке мозга (n=6). * - $p < 0,001$.

Исследование ИЛ-1 β , ИЛ-6 позволило обнаружить увеличение их содержания в крови животных с экспериментально вызванным ОМ. Из литературных данных известно, что ИЛ-1 β , введенный в желудочки мозга подвергшихся 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии, увеличивал ОМ и размер церебрального инфаркта [19]. ИЛ-6 является одним из основных регуляторов воспаления в нервной ткани, активируя эндотелиальные клетки, макрофаги (микроглию) и вызывая инфильтрацию и активацию нейтрофилов. Согласно некоторым исследованиям, известно, что при ОМ и ишемии повышено содержание ИЛ-6 и авторы считают, что повышение концентрации ИЛ-6 в периферической крови может быть ранним прогностическим признаком развития нейровоспаления и обусловленного им отека мозга [20].

Исследование концентрации противовоспалительных цитокинов позволило обнаружить уменьшение их содержания у животных с ОМ. Предварительное введение противовоспалительных цитокинов (TGF- β , ИЛ-10) угнетает выработку ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α [21]. Возможно, баланс между провоспалительными и ингибиторными, противовоспалительными цитокинами является критическим в определении степени выраженности воспалительного, нейроиммунного процесса в мозговой ткани и является важным механизмом повреждения вещества головного мозга при развитии ОМ.

В следующем эксперименте мы провели исследование по определению содержания продуктов свободнорадикального окисления липидов, так как известно, что свободные радикалы в мозге могут образовываться в ответ на действие провоспалительных цитокинов. В головном мозге интактных животных нами обнаружен определенный стационарный уровень интенсивности свободнорадикальных реакций (таблица). Развитие ОМ сопровождается активированием процесса ПОЛ, что выражается в увеличении содержания диеновых конъюгатов, гидроперекисей и МДА. Увеличению содержания перекисей в головном мозге способствует высокое содержание в нём легкоокисляемых субстратов, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, катехоламины, сравнительно низкий уровень антиоксидантов - глутатиона и витамина Е и фермента супероксиддисмутазы. Показано, что антиоксиданты способны одновременно подавлять и процессы ПОЛ, и экспрессию провоспалительных цитокинов (в том числе ФНО α) клетками глии [22].

ЦИТОКИНЫ И ГАНГЛИОЗИДЫ ПРИ ОТЕКЕ МОЗГА

Таблица. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и сфингозина в головном мозге в норме и при экспериментальном отеке мозга.

Показатели	Контроль	Отек мозга
Дienesовые коньюгаты (нмоль/мг белка)	1,63 ± 0,2	3,8 ± 0,23*
Гидроперекиси (нмоль/мг белка)	0,55 ± 0,02	0,91 ± 0,03*
МДА (нмоль/мг белка)	5,8 ± 1,2	10,3 ± 1,4*
Сфингозин (мкмоль/гр белка)	33,5 ± 3,4	20,2 ± 1,8*

Примечание. Приведены средние величины ± ошибки средних. В каждой серии n = 7. * - p < 0,001.

Высокое содержание в головном мозге ганглиозидов и уникальность их структуры определяет характер развития клеточного ответа на действие цитокинов в мозге. В этой связи нами проведено исследование по определению количественного содержания ГЗ в нейроглиальной фракции головного мозга крыс с моделированным ОМ. При изучении состава ГЗ во фракции микроглии головного мозга (рис. 2) нами обнаружены 4 представителя этих соединений, отличающиеся содержанием нейраминных кислот, характеризующихся высоким уровнем обменяемости. Установлено, что в нейрональной фракции выделенной от животных с ОМ наблюдается уменьшение всех основных фракций ГЗ (моно-, ди-, три-, тетраасиалганглиозидов). Указанные гликолипиды располагаются во внешнем монослое плазматических мембран, таким образом, что их углеводная цепь, несущая суммарный отрицательный заряд, экспонирована во внешнюю среду. Регуляция состава гликофинголипидов в плазматической мембране может оказывать эффект и на возбудимость нейрона, так как ГЗ насыщены молекулами сиаловой кислоты, а сиаловые кислоты, как известно, несут отрицательный заряд. В нейронах спинных ганглиев, у которых повреждены аксоны, вследствие пережатия, изменяется метаболизм ГЗ, что сопровождается повышением количества молекул сиаловой кислоты на клеточной мембране. Считается, что повышение отрицательного заряда плазматической мембраны (за счёт молекул сиаловой кислоты) приводит к гипервозбудимости нейрона [23].

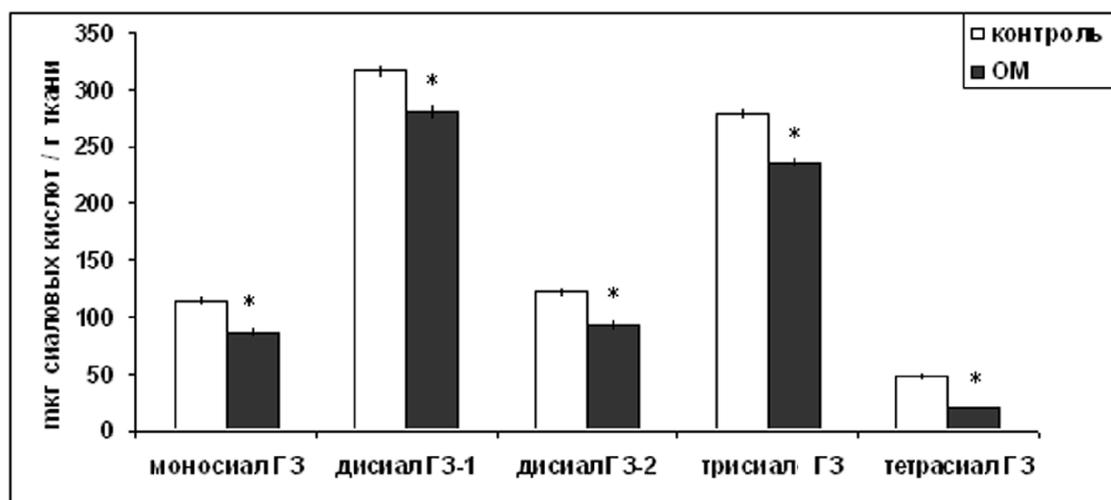


Рисунок 2.

Содержание ганглиозидов (мкг сиаловых кислот/г ткани) в нейроглиальной фракции головного мозга при ОМ, (n=7). * - p < 0,01.

ГЗ образуются на основе N-ацил-сфингозина (церамид) через образование цереброзида, и главное их отличие от цереброзидов заключается в наличии в своей структуре N-ацетилнейраминовой кислоты. Одним из продуктом гидролитического распада ГЗ является сфингозин. Исследования содержания сфингозина (таблица) позволило обнаружить увеличение его содержания в головном мозге, что по всей видимости, объясняется гидролитическим распадом ГЗ. Сфингозину в настоящее время придается большое значение в связи с его способностью индуцировать апоптоз [24]. Известно, что ФНО α передает сигнал, индуцирующий клеточный апоптоз, посредством связывания с соответствующими ФНО α -рецепторами (55 и 75 кДа). Апоптотической гибели клеток при действии ФНО α подвергаются и нейроны, и клетки глии. Из литературных данных известно, что совместная инъекция ФНО α и сфингозина индуцирует апоптоз в клетках [24]. По всей видимости, увеличение сфингозина, полученного от ганглиозидов играет определенную роль в развитии патологического процесса в головном мозге животных с отёком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что патогенез ОМ связан с накоплением провоспалительных цитокинов, активацией свободнорадикальных процессов, уменьшением содержания ГЗ и увеличением количества сфингозина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Квитницкий-Рыжов Ю.Н.* (1988) Современное учение об отёке и набухании головного мозга, Киев, Здоровье.
2. *Hasko G., Elenkov I.J., Vizi E.S.* (1995), *Immunol. Lett.*, **47**, 133-137.
3. *Szelenyi J., Kiss J.P., Vizi E.S.* (2000), *Neuroimmunol.*, **103**, 34-40.
4. *Ярилин А.А.* (1997) *Иммунология*, **5**, 7-14.
5. *Рожнова У.А., Алесенко А.В.* (1999) *Нейрохимия*, **16**(2), 118-132.
6. *Fiers W.* (1991) *FEBS Letters*, **285**, 199-212.
7. *Мартынова Е.А.* (1998) *Биохимия*, **63**, 122-132.
8. *Овсепян Л.М., Закарян Г.В., Карагезян К.Г.* (2005) *Нейрохимия*, **22**(3), 195-201.
9. *Пичугина Л.В., Пинегин Б.В.* (2008) *Иммунология*, **1**, 55-63.
10. *Флеров М.А.* (1978) *Вопр. мед. химии*, **24**(2), 174-179.
11. *Романова Л.А., Стальная И.Д.* (1977) в кн: *Современные методы в биохимии М. Медицина*, с. 64-66.
12. *Стальная И.Д.* (1977) в кн: *Современные методы в биохимии М. Медицина*, с. 62-64.
13. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* (1972) *Переокисное окисление в биологических мембранах*. М. Наука.
14. *Lowry N.J., Rosenbrough A.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **153**, 265-275.
15. *Туманова С.Ю.* (1978) *Биохимия*, **43**(3), 387-398.
16. *Lauter C.J., Trams E.G.* (1962) *J. Lipid Res.*, **3**, 135-138.
17. *Zhang M., Tracey K.J.* (1998) in: *The cytokine handbook* (A.W. Thompson, ed.), New York, Academic Press, vol. 3, pp. 515-548.
18. *Гутнер У.А., Дудник Л.Б., Коробко В.Г., Алесенко А.В.* (2005) *Журнал Неврологии и психиатрии им. Корсакова*, **5**, 45-52.
19. *Yamasaki Y., Yamaya H., Watanabe M. et al.* (1991) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**(1), 113-118.
20. *Zhang X.* (2006) *Neurol. India*, **54**, 402-407.
21. *Chen C.C., Manning A.M.* (1996) *Сytokine*, **8**, 58-65.
22. *Chen C.Y., Huang Y.L., Lin T.H.* (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **356**, 127-132.
23. *Азрова Н.Ф., Соколова Т.Б., Захарова И.О.* (2008) *Нейрохимия*, **25**(1-2), 90-98.
24. *Алесенко А.В., Гальперин Э.И., Дудник Л.Б.* (2002) *Биохимия*, **67**, 1632-1642.

Поступила: 02. 07. 2009.

**STUDY OF CYTOKINES CONTENT AND GANGLIOSIDES METABOLISM
AT EXPERIMENTAL BRAIN EDEMA**

A.V. Zakaryan, G.S. Kazaryan, G.V. Zakaryan, M.M. Melkonyan, L.M. Hovsepyan

Institute of Molecular Biology NAS RA, Hasratyan st., 7, Yerevan, 0014 Armenia;
tel: (37410) 243 609; e-mail: lhovs@yahoo.com

The content of cytokines, and gangliosides metabolism, and the quantity of lipid peroxidation products were studied at experimental brain edema. Data obtained show increase the level of proinflammatory cytokines and decrease the level of antiinflammatory cytokines during development of brain edema. Along with this we reveal the accumulation of lipid peroxidation products (diene conjugates, hydroperoxides, and malonic dialdehyde). Each fraction of gangliosides decreased, but the product of their hydrolytic dissociation sphingosine increased at experimental brain edema.

Key words: brain edema, cytokines, gangliosides, sphingosine.