

ВЛИЯНИЕ ЦЕРЕБРАЛА НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

В. Г. Аркадьев, Л. В. Новик, А. Ю. Пустоваров, Ю. Н. Максимов, А. Н. Макаренко¹

Представлены данные по разработке трех (различающихся по степени тяжести) экспериментальных моделей геморрагического инсульта у мышей. Показано, что наиболее адекватной для изучения иммунной системы является модель легкой степени острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). ОНМК характеризуется снижением массы тимуса, угнетением синтеза антител (гемолизинов) и усилением реакции гиперчувствительности замедленного типа. Церебрал (особенно при интраназальном введении) снижал летальность животных и способствовал нормализации изученных иммунологических показателей.

Ключевые слова: антиинсультное средство, экспериментальный геморрагический инсульт, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет

ВВЕДЕНИЕ

Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о значительных нарушениях, развивающихся в иммунной системе, при инсульте, что во многом определяет течение и исход заболевания.

Многие лекарственные препараты, используемые для лечения острой недостаточности мозгового кровообращения (ОНМК), обладают иммуностимулирующими свойствами, что значительно повышает эффективность терапии [7]. В последние годы в лечении ОНМК намечился некоторый прогресс. Это связано с изучением и использованием в качестве антиинсультных и нейропротекторных средств низкомолекулярных пептидных факторов эндогенного происхождения из семейства ростовых факторов нервной ткани (NT-family) и их регуляторов — церебролизина; Cerebral и др. [10, 11, 15].

Одним из таких средств является церебрал, разрабатываемый в Украине с 1988 г. [2, 6, 12].

Задачей настоящего исследования было изучение влияния церебрала на иммунную систему животных в условиях различных моделей инсульта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 118 нелинейных мышах обоего пола массой 18–22 г, у которых моделировали геморрагический инсульт различной степени тяжести.

У всех животных (анестезия диэтиловым эфиром) производили сагитальное рассечение покровных тканей в лобной, теменной и затылочной областях, удаляли надкостницу с костей свода черепа, высверливали 2 отверстия (проекция внутренней капсулы — С. I.) в области правого и левого полушарий.

У животных I группы (легкое течение ОНМК) моделирование геморрагического мозгового инсульта осу-

ществляли с помощью участка металлического мандрена, девиантно выступающего из предварительно подготовленной инъекционной иглы, дополненной резиновым фиксатором.

Мозг травмировали 5–6 вращательными движениями мандрена (по часовой стрелке), то есть посредством “конусообразного” подсекающего действия ткани мозга и повреждения сосудов в области С. I. на глубине 1,3–1,6 мм [4].

Животным II группы (инсульт средней тяжести) дополнительно (во фронтальной плоскости) прямым мандреном разрушали центральную часть подсекающего тканевого конуса С. I., а также расположенных выше участков полушарий.

Мышам III группы (тяжелая форма ОНМК) в указанные области разрушения обоих полушарий дополнительно вводили 0,05–0,08 мл собственной крови.

В процессе исследования изучали выживаемость животных и определяли ряд иммунологических показателей.

Для изучения состояния иммунной системы были избраны экспериментальные модели, характеризующие гуморальное и клеточное звенья иммунитета: первичный иммунный гуморальный ответ на тимусзависимый антиген и реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [1, 3, 9]. Изменения в развитии и выраженности этих реакций под влиянием патологического процесса свидетельствуют о характере и направленности нарушений иммунологической реактивности организма.

В качестве тимусзависимого антигена использовали эритроциты барана (ЭБ). Реакцию оценивали по титрам циркулирующих антител (гемолизинов и гемагглютининов) на микропанелях на 7-е сутки после иммунизации, которую проводили через сутки после операции. У животных регистрировали массу тела, тимуса и селезенки.

Клеточное звено иммунитета оценивали по реакции ГЗТ, дающей представление о функциональной активности Т-лимфоцитов. Эта модель позволяет опреде-

¹ Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев, 252057, ул. Эжена Потье, 14.

лить влияние развивающейся цереброваскулярной патологии на продукцию сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов, вовлекающих в иммунный ответ клетки мононуклеарных фагоцитов.

В процессе постановки реакция ГЗТ мышей сенсibilизировали ЭБ (однократно внутрибрюшинно в дозе $2 \cdot 10^5$ клеток в объеме 0,5 мл на 20 г массы тела). Через 5 суток животным в подушечку задней лапы (опыт) вводили 10^8 ЭБ в объеме 0,02 мл, а в правую лапу (контроль) вводили изотонический раствор натрия хлорида в том же объеме. Через 24 ч у животных определяли массу региональных (подколенных) лимфатических узлов, результаты опыта оценивали по отношению массы опытного лимфоузла к массе контрольного.

В связи с отсутствием модели геморрагического инсульта у мышей задачей наших исследований явилась попытка создания модели для изучения состояния их иммунной системы. Описанные выше варианты травматизации предполагали воспроизведение различной степени тяжести ОНМК у мышей. На этом фоне следовало дать оценку реагирования системы иммунной защиты по выбранным иммунологическим показателям.

Животным опытной группы вводили церебрал интраназально или внутрибрюшинно в дозе 0,1 мг/кг массы. При интраназальном способе введения церебрал растворяли в дистиллированной воде из расчета 0,5 мг/мл животному в положении “на спине” закапывали по 1 капле в оба носовых хода. В последующем раствор препарата хранили в холодильнике ($0 - 2^\circ\text{C}$) и применяли по схеме (7 дней 1 раз в сутки), начиная с 1-х суток (через 3 – 4 ч после воспроизведения инсульта). Животным контрольной группы закапывали дистиллированную воду.

При статистической обработке полученных данных использован *t*-критерий Стьюдента [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование острого инсульта у мышей сопровождается значительными нарушениями в иммунной системе (табл. 1). Это проявляется изменениями массы основных лимфоидных органов — тимуса и селезенки, нарушением процессов антителообразования и развития реакции ГЗТ.

Моделирование тяжелой формы инсульта (III серия опытов) не позволило провести исследования всех иммунных показателей в динамике по причине быстрой гибели животных (1 – 3 сут). При этом отмечалось значительное снижение массы тимуса и увеличение массы селезенки.

Моделирование ОНМК I (легкой) и II (средней) степени тяжести характеризуется тремя особенностями реагирования иммунной системы у мышей: снижением массы тимуса, угнетением образования гемолизинов и повышением уровня реакции ГЗТ. Количество агглютинирующих антител увеличивается особенно в I группе (см. табл. 1).

Оценивая результаты данного этапа исследований можно заключить, что наиболее удобной моделью острого инсульта у мышей для изучения реагирования иммунной системы и лечебного действия церебрала является первая модель поражения. При необходимости углубленных исследований патологии ОНМК возможно моделирование средней, т.е. II степени тяжести заболевания.

Следующим этапом работы было изучение лечебного действия церебрала при легкой степени тяжести инсульта, которая сопровождалась значимыми нарушениями со стороны иммунной системы. Была по-

Таблица 1. Изменения иммунологических показателей при моделировании ОНМК различной степени тяжести у мышей (*M* – *m*)

Характер опыта	Характер травмы	Количество животных	Погибшие животные, %	Масса тела, г				Масса селезенки				Масса тимуса				Сывороточные антитела, log ₂				Индекс реакции ГЗТ	
				исходная	окончание опыта (14-е сут)			абс., мг	%			абс., мг	%			гемолизины	агглютинины				
Контроль	Интakтные животные	21	0	20,5	0,5	22,0	1,0	220,0	12,5	1,0	0,01	46,5	1,2	0,21	0,02	11,8	0,2	6,8	0,2	1,38	0,12
I группа (легкая степень)	Двухстороннее разрушение С. I.	32	25	21,0	0,45	23,0	0,4	180,0	5,1*	0,78	0,03	34,4	0,3*	0,14	0,01	9,3	0,3*	7,8*	0,2	1,85	0,1*
II группа (повреждение средней тяжести)	Двухстороннее разрушение С. I. + дополнительная травма	30	74	19,0	0,5	20,3	0,8	208,0	10,3	1,0	0,3	21,5	0,5*	0,11	0,01	8,5	0,3*	7,3	0,12	2,08	0,2*
III группа (тяжелая форма)	Двухстороннее разрушение С. I. + травма + введение аутокрови	22	86	18,5	0,5	—	—	264,0	7,5*	—	—	16,0*	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. * – различия статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению к интактным животным.

Таблица 2. Влияние церебрала на иммунологические показатели мышей с острой недостаточностью мозгового кровообращения (ОНМК) (M m)

Характер опыта	Погибшие животные, %	Масса тела, г				Масса селезенки				Масса тимуса				Сывороточные антитела, log ₂				Индекс реакции ГЗТ	
		исходные данные	окончание опыта (14-е сут)			абс., мг		%		абс., мг		%		гемолизины		гемагглютинины			
Контроль (интактные животные, 7)	0	22,0	1,0	23,0	1,8	212,0	9,4	0,8	0,09	40,5	0,8	0,17	0,02	11,2	0,2	6,8	0,2	1,3	0,1
ОНМК (24)	30	18,7	0,7	22,5	1,0	180,0	5,2	0,84	0,02*	32,0	0,2*	0,2	0,02	9,5	0,3*	8,0	0,25*	1,98	0,2*
ОНМК + церебрал внутривнутрибрюшинно (24)	20	18,3	0,7	20,8	1,1	188,0	8,2	0,88	0,07	30,0	4,2*	0,13	0,01	9,3	0,5*	5,75	0,5**	1,65	0,3
ОНМК + церебрал интраназально (24)	16,5	18,5	0,5	22,0	1,0	168,0	8,0	0,65	0,03	42,2	1,7**	0,19	0,01	9,8	0,6	6,6	0,8	1,32	0,12

Примечание. Различия статистически значимы ($p < 0,05$) по отношению: * — к интактным животным, ** — к ОНМК. В скобках — количество животных.

ставлена серия опытов с использованием церебрала в дозе 0,1 мг/кг при двух путях его введения — внутрибрюшинном и интраназальном.

Представленные в табл. 2 результаты подтверждают полученные данные о значительных нарушениях в иммунной системе при воспроизведении модели ОНМК I степени. Эти нарушения выражались в усилении продукции гемагглютинирующих антител при одновременном снижении титров гемолизинов, снижении массы тимуса и усилении реакции ГЗТ. Церебрал на данной модели инсульта снижал число погибших животных, особенно при интраназальном пути введения препарата. В отличие от группы животных, получавших церебрал внутривнутрибрюшинно, интраназальное введение предотвратило возникновение нарушений (по отношению к контролю ОНМК) изучаемых иммунологических показателей (см. табл. 2).

Ранее было установлено, что используемые в клинической практике антиинсультные препараты — циннаризин, бровинкамин, никардипин, гидергин, цинпазид в отличие от винпоцетина и церебролизина на моделях мозговой ишемии не проявляли антиишемического действия и не способствовали увеличению выживаемости животных. Они были малоэффективны и как иммунопротекторные средства [13–15]. В противоположность церебрал, который включает ряд регуляторных пептидных факторов нейротрофинов (мол. масса до 1200 Д), нейропептиды, аминокислоты, молекулы других веществ, оказывает позитивное влияние на изучаемые показатели. В частности, интраназальное введение церебрала значительно повышает выживаемость животных с различными вариантами острой патологии мозгового кровообращения. Внутривнутрибрюшинное введение препарата в течение 7 дней оказывает менее выраженное действие.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о иммунопротекторном действии церебрала на иммунную систему мышей при ОНМК. Получен-

ные результаты согласуются с опубликованными данными о влиянии церебрала *in vitro* на иммунокомпетентные клетки человека [5].

ВЫВОДЫ

1. Моделирование острой недостаточности мозгового кровообращения – ОНМК (легкая степень) на мышцах сопровождается нарушениями в иммунной системе.
2. Церебрал при данной патологии благоприятно влияет на иммунную систему, что проявляется снижением числа погибших животных и нормализации ряда иммунологических показателей.
3. Церебрал при интраназальном введении оказывает более выраженное терапевтическое действие при ОНМК в сравнении с внутривнутрибрюшинным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. В. Гюллинг, М. Б. Самбур, *Физиологический журнал*, 27(2), 237–240 (1981).
2. Т. О. Дев’яткина, О. М. Важніча, О. М. Макаренко, *Ліки*, № 5 – 6. С. 66 – 70 (1999).
3. Э. Зигль, *Реакция гемагглютинации. Иммунологические методы*, Мир, Москва (1979), сс. 108 – 112.
4. Н. С. Косицын, С. В. Карпенко, А. Н. Макаренко, В. А. Мишина, Авторское свидетельство № 17675118 А1 от 08.06.1992.
5. Л. В. Кузнецова, *IN-Factors та його вплив на Т-лімфоцити хворих на бронхіальну астму*, Збірник наук праць співр. КМАПО ім. П. Л. Шупіка, Вип. 7, кн. 1, Київ (1998), сс. 476 – 479.
6. О. М. Макаренко, Ю. Н. Корольов, Патент України № 24299А від 07.07.1998 р. і 24299 від 01.03.2000 р.
7. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей*, Т. 2, Торсинг, Харьков (1997), с. 105.
8. Е. В. Монцевичуте – Эрингене, *Пат. физиол.*, 13(4), 71 – 78 (1964).
9. Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, В. М. Манько, Е. В. Кожинова и др., *Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуно-*

- модулирующего действия фармакологических средств, Москва (1984), с. 37.
10. L. Benowitz, *Eur. J. Neuropsychopharm*, **10**, Suppl. 4, S. 12, 23 (2000).
 11. S. V. Kravchenko, A. N. Makarenko, *Proc of the XXII nd Ann. Mtg of NES (6–9 April, Hakone, Japan)*, Tokyo (1995), pp. 157–160.
 12. L. V. Kuznetsova, V. S. Lapenko, N. A. Dzeruzhinskaya, L. O. Osypova, et al., *4th Int. Congr. Sona'99 (Dakar, Senegal, 12–16 April, 1999)*, Dakar (1999), p. 30.
 13. J. C. Lamar, *Protective effect of the Vinpocetin in pharmacological brain ischemic models. Int. Symp. Pharmacology of Cerebral Ischemia. Marburg, Germany. Abstracts Book* (1986), p. 120.
 14. A. Nagaoka, T. Imai, E. Otamo, *J. Japan Pharm.*, **12**(7), 209–213 (1984).
 15. H. Xiong, A. Baskys, J. M. Woitowicz, *Brain Res.*, **737**(7), 188–194 (1996).

Поступила 23.04.2001.

THE PROMISING ANTISTROKE DRUG CEREBRAL INFLUENCES THE IMMUNE SYSTEM OF ANIMALS WITH EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC STROKE

V. G. Arkadiev, L. V. Novik, A. Yu. Pustovarow, Yu. N. Maksymov, and A. N. Makarenko

Department of Pathophysiology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Data on the development of three experimental models of hemorrhagic stroke in mice are reported. The models differ in the extent of damage. From the standpoint of the immunopharmacological investigation, most adequate model is provided by the light acute brain circulation disorder (LABCD). In the LABCD model, the hemorrhagic stroke is characterized by reduction in the thymus weight, inhibition of the antibody (hemolysin) synthesis, and enhancement of the delayed type hypersensitivity response. The new antistroke drug cerebral decreased (especially after intranasal administration) the level of lethality in experimental animals and improved the immunological indices.