

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 612.015.32:611.81

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОЛИПИДОВ, СФИНГОЗИНА И ЦИТОКИНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ПРИ ЕГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТЕКЕ

Г. В. ЗАХАРЯН

*Ереванский государственный медицинский университет
имени Мхитара Гераци, Республика Армения;
email: gayane.zak@gmail.com*

Определяли содержание цереброзидов и ганглиозидов, а также продукта их гидролитического распада — сфингозина — в головном мозгу и параллельно — цитокиновый профиль про- и противовоспалительных цитокинов в крови крыс с экспериментальным отеком мозга. Обнаружено уменьшение содержания общей фракции гликолипидов и увеличение сфингозина в мозгу крыс, а также увеличение содержания провоспалительных и уменьшение противовоспалительных цитокинов в крови крыс при развитии экспериментального отека мозга.

Ключевые слова: отек мозга, гликолипиды, сфингозин, цитокины.

Предотвращение возникновения отека-набухания головного мозга представляет собой одну из актуальных проблем современной медицины. Под отеком мозга (ОМ) понимают процесс избыточного накопления воды в межклеточных пространствах ткани мозга, наступающий вследствие нарушения баланса между кровью и тканями. При увеличении объема мозга в ограниченном внутричерепном пространстве происходит его сдавление и нарушается мозговое кровообращение, приводящее к ишемии мозга [1]. Отек мозга возникает в результате травматических нарушений (черепно-мозговая травма) гипоксических воздействий, интоксикаций. С ним сталкиваются при проведении реанимационных мероприятий, а также у больных с различными формами кровоизлияния в мозг.

Вследствие ишемии наблюдается ряд метаболических нарушений, приводящих к гибели нервных клеток. К таким нарушениям относятся: эксайтотоксичность — повреждающее действие на нейроны повышенных концентраций возбуждающих аминокислот (глутамата, аспартата); окислительный стресс — повреждение мембран нейронов токсичными свободными кислородными радикалами и продуктами пероксидного окисления липидов (ПОЛ);

митохондриальная дисфункция; гиперэкспрессия ранних генов; дефицит нейротрофических факторов, инициирующих нейроапоптоз [2–4].

Гликолипиды являются не только структурными элементами клеточных мембран, но также играют определяющую роль в процессах клеточного узнавания, регуляции роста и дифференцировке клеток, в пролиферации и апоптозе.

Целью настоящего исследования явилось определение содержания ганглиозидов (ГЗ) и цереброзидов (ЦР), а также продукта их гидролитического распада — сфингозина (СФ), в головном мозгу животных с экспериментальным отеком мозга. Параллельно проведено исследование взаимосвязи между концентрациями про- и противовоспалительных цитокинов.

Материалы и методы

Исследование проводили на беспородных белых крысах с массой тела 170–200 г. Токсический отек 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 [5]. О содер-

жании воды судили по сухому остатку ткани мозга после высушивания при 110 °С до постоянной массы.

Экстракцию липидов ткани головного мозга осуществляли по методу Фолча. После промывки 0,1%-ым раствором NaCl, верхний водно-метанольный слой экстракта использовался для определения общей фракции ГЗ, а нижний слой, содержащий хлороформ – для определения общей фракции ЦР [6].

Выделение осадка ЦР основано на их способности образовывать плотный белый слой на границе хлороформного и водного слоев при обработке хлороформ–метанольного экстракта липидов трихлоруксусной кислотой и водой. Содержание ЦР определяли по углеводному компоненту при длине волны 505 нм [6] в цветной реакции с резорцином.

Раствор ГЗ после диализа и лиофилизации пропускали через колонку с ДЕАЕ-сефадексом А-25. О содержании ГЗ судили по определению N-ацетилнейраминовой кислоты периодат-резорциновым методом [7].

Для выделения сфингозиновых оснований ЦР и ГЗ подвергали кислотному метанолизу с последующей экстракцией сфингозиновых оснований. Гидролиз ГЗ проводили смесью конц. HCl: вода : метанол (8,6 : 9,4 : 82) в течение 18 ч при 80 °С; гидролиз ЦР смесью конц. H₂SO₄ : метанол (1 : 20) в течение 6 часов. Сфингозин экстрагировали этилацетатом, окрашенный комплекс с метилоранжем фотометрировали на СФ при длине волны 415 нм [8].

Определение концентраций фактора некроза опухоли α (ФНО α) и провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6) и противовоспалительных (TGF- β , ИЛ-10) интерлейкинов проводили с помощью иммуноэнзимного анализа (Enzyme Linked Immunoassay – ELISA). Для определения цитокинов использовали коммерческие иммуноэнзимные наборы (Sigma, США). Интенсивность реакции оценивали с помощью ELISA-ридера [9].

Статистическую значимость результатов оценивали методом Стьюдента.

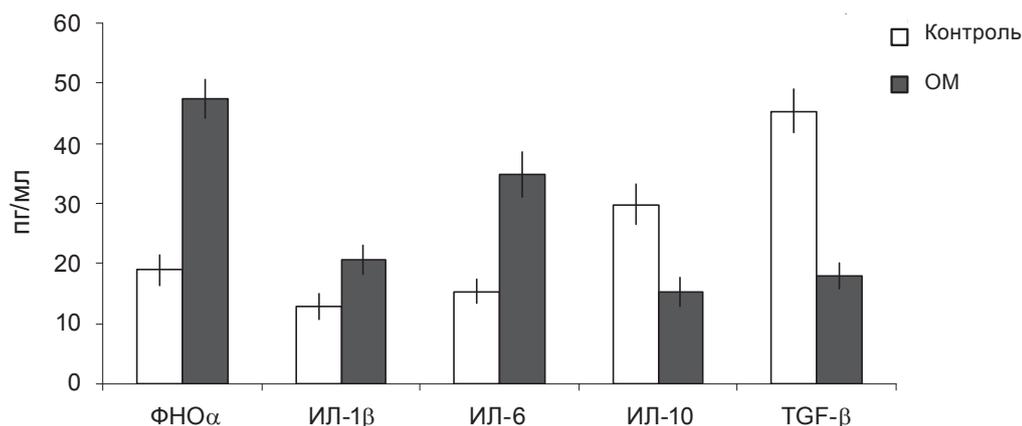
Результаты и обсуждение

Для определения количества сфингозина необходимо было определить общее содержание ГЗ и ЦР в головном мозгу животных с экспериментальным ОМ. Как показали результаты исследований, экспериментальный ОМ характеризуется статистически достоверным уменьшением содержания ГЗ в общей фракции по сравнению с контролем. Исследование позволило также обнаружить уменьшение содержания ЦР при экспериментальном ОМ (таблица). Указанные соединения являются обязательными компонентами плазматических мембран клеток и являются важнейшими участниками передачи нейрональной информации. Снижение их содержания в головном мозгу при его отеке приводит к нарушению основных функций мембран.

Изучение продукта гидролитического распада ГЗ и ЦР – сфингозина – показало увеличение его содержания в головном мозгу животных с ОМ (табл.). Церамиды и сфингозин являются медиаторами апоптоза и образуются внутриклеточно как продукты катаболизма сфингомиелина (сфингомиелин/сфингомиелиназный механизм) и/или расщеплением галактозил-глюкозилцерамида (галактозилцерамид/глюкозидазный механизм) лизосомными и цитоплазматическими гидролазами. Свободный сфингозин образуется из церамида в результате энзиматического расщепления сфингомиелиназой и цераминидазой, вследствие чего образуется свободный сфингозин и жирная кислота [10]. Сфингомиелиназа обнаружена практически во всех клетках, но наибольшее количество ее содержится в клетках мозга (в миелине). В последнее время в литературе появились доказательства зависимости активности сфингомиелиназ от уровня окислительных процессов в клетке, причем существенную роль в активации сфингомиелиназы играет окислительный стресс. При повышении образования пероксидов липидов увеличивается активность сфингомиелиназ [11].

Содержание гликолипидов и продукта их гидролитического распада сфингозина в общей фракции ткани головного мозга животных с ОМ (n = 7)

Ганглиозиды, мкг сиаловых кислот/г ткани		Цереброзиды, мкг галактозы/г ткани	
Контроль	Отек мозга	Контроль	Отек мозга
774,3 ± 12,5	652,6 ± 14,2 (P < 0,001)	17,8 ± 1,5	10,54 ± 1,7 (P < 0,01)
Сфингозин, полученный из ГЗ		Сфингозин, полученный из ЦР	
55,18 ± 4,70	75,33 ± 4,90 (P < 0,001)	4,12 ± 0,6	7,2 ± 0,4 (P < 0,01)



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

Накопление в клетках головного мозга церамида и сфингозина приводит к активации процессов апоптоза. Важнейшую роль в индукции апоптоза посредством активации церамида и сфингозина играют цитокины [12]. Они делятся на регуляторные или противовоспалительные (ИЛ-10, ИЛ-4) и провоспалительные (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α и др.) [13].

Исходя из этого, нами было проведено определение содержания цитокинов при ОМ. Как показали результаты, при ОМ наблюдается увеличение концентрации ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-1 β в крови (рисунок). ФНО α и ИЛ-1 β в низких концентрациях играют важную роль в регуляции иммунного ответа и тканевого гомеостаза, а в высоких — оказывают патологическое эндокриноподобное действие, вызывая микрососудистую гиперкоагуляцию и гемодинамические нарушения. Предполагают, что ФНО α является ключевым медиатором микроглиальных нейроиммунных функций, оказывающим повреждающее воздействие на миелин и олигодендроциты, вырабатывается локально в ответ на ишемизацию головного мозга [14]. Присоединение молекулы цитокина к специфическому рецептору (р-55 и р-75) запускает ряд сигнальных реакций: активацию каскада протеинкиназ, активацию транскрипционного фактора NF- κ B, экспрессию NO-синтазы и генерацию NO, а также активацию фосфолипаз C, A $_2$ и сфингомиелиназы [15]. Из данных литературы известно, что совместная инъекция ФНО α и сфингозина индуцирует апоптоз в клетках [16]. Вероятно, увеличение сфингозина, полученного из ГЗ и ЦР играет определенную роль в развитии патологического процесса в головном мозгу животных с отеком.

Определение содержания ИЛ-1 β , ИЛ-6 позволило обнаружить его увеличение в крови животных с экспериментальным ОМ. Из данных литературы известно, что ИЛ-1 β , введенный в желудочки мозга, подвергшегося 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии, увеличивал отек мозга и степень церебрального инфаркта [17]. 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, при ишемии повышено содержание ИЛ-6, и считается, что повышение содержания ИЛ-6 в периферической крови может быть ранним прогностическим признаком развития нейровоспаления и обусловленного им отека мозга [18].

При определении содержания противовоспалительных цитокинов установлено их уменьшение у животных с ОМ. Предварительное введение противовоспалительных цитокинов (TGF- β , ИЛ-10) угнетает выработку ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α [18].

Баланс между провоспалительными и ингибиторными, противовоспалительными цитокинами, вероятно, является критическим в определении степени выраженности воспалительного, нейроиммунного процесса в мозговой ткани и является важным механизмом повреждения вещества головного мозга при развитии ОМ.

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что патогенез ОМ связан с накоплением сфингозина и провоспалительных цитокинов.

ЗМІНИ ВМІСТУ ГЛІКОЛІПІДІВ, СФІНГОЗИНУ І ЦИТОКІНІВ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ПРИ ЙОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ НАБРЯКУ

Г. В. Захарян

Єреванський державний медичний університет
імені Мхітара Гераці, Республіка Вірменія;
e-mail: gayane.zak@gmail.com

Встановлено вміст цереброзидів і гангліозидів, а також продукту їх гідролітичного розпаду – сфінгозину – в головному мозку і паралельно визначено цитокіновий профіль про- і протизапальних цитокінів у крові щурів з експериментальним набряком мозку. Виявлено зменшення вмісту загальної фракції гліколіпідів і збільшення сфінгозину в мозку щурів, а також збільшення вмісту прозапальних і зменшення протизапальних цитокінів у крові під час розвитку експериментального набряку мозку.

Ключові слова: набряк мозку, гліколіпіди, сфінгозин, цитокіни.

CHANGES IN CONTENT OF GLYCOLIPIDS, SPHINGOSINE AND CYTOKINES IN THE RAT BRAIN WITH EXPERIMENTAL EDEMA

G. V. Zakaryan

M. Heratsi Yerevan State Medical
University, Yerevan, Armenia;
e-mail: gayane.zak@gmail.com

Summary

The study of the content of cerebroside, gangliosides and their hydrolytic degradation product – sphingosine in the rat brain with experimental edema was carried out. In parallel, the cytokine profile of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood of rats with experimental cerebral edema was studied.

The experiments indicated that a decrease of the total fraction of glycolipids and an increase of sphingosine content in the brain of rats with brain swelling were observed. The development of brain edema was accompanied by the increase in pro-inflammatory and decrease in anti-inflammatory cytokine content.

Key words: brain edema, glycosphingolipids, sphingosine, cytokine.

1. Квитницкий-Рыжов Ю. Н. Современное учение об отеке и набухании головного мозга. – К., Здоров'я, 1988. – 183 с.
2. Беленичев И. Ф., Колесник Ю. М., Павлов С. В. и др. // Межд. неврол. журн. – 2008. – № 4 (20). – С. 23–29.
3. Бурчинский С. Г. // Новости мед. фарм. – 2004. – № 10–11. – С. 6–7.
4. Болдырев А. А. // Усп. физиол. наук. – 2003. – 34, № 3. – С. 21–34.
5. Овсепян Л. М., Захарян Г. В., Карагезян К. Г. // Нейрохимия. – 2005. – 22, № 3. – С. 195–201.
6. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований. – Л., из-во Ленингр. универ., 1982. – 272 с.
7. Svennerholm L. // ADV Genet. – 2001. – 44. – P. 33–41.
8. Lauter C. I., Trams E. G. // J. Lipid Res. – 1962. – 3. – P. 136–138.
9. Пичугина Л. В., Пинегин Б. В. // Иммунология. – 2008. – 1. – С. 55–63.
10. Рожнова У. А., Алесенко А. В. // Нейрохимия. – 1999. – 16, № 2. – С. 118–132.
11. Цюпка А. Н., Дудник Л. Б., Евстигнеева Р. П., Алесенко А. В. // Биохимия. – 2001. – 66, № 9. – С. 1263–1270.
12. Мюльберг А. А., Гришина Т. В. // Усп. физиол. наук. – 2006. – 37, № 1. – С. 18–27.
13. Ярилин А. А. // Иммунология. – 1997. – 5. – С. 7–14.
14. Zhang M., Tracey K. J. / The cytokine handbook. – 1998. – 3. – New York. Academic press. – P. 515–548.
15. Гутнер У. А., Дудник Л. Б., Коробко В. Г., Алесенко А. В. // Журн. неврол. и псих. им. Корсакова. – 2005. – 5, № 4. – С. 45–52.
16. Yamasaki Y., Yamaya H., Watanabe M. et al. // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 1991. – 13. – P. 113–118.
17. Zhang X. // Neurol. India. – 2006. – 54, N 4. – С. 402–407.
18. Chen C. C., Manning A. M. // Cytokine. – 1996. – 8, N 1. – P. 58–65.

Получено 05.09.2011