

# Цитокінова терапія в комплексному лікуванні цереброваскулярних захворювань: стан, перспективи досліджень

**Е.В. Супрун**<sup>1</sup>, д.мед.н., професор, завідувачка кафедри,

**І.С. Чекман**<sup>2</sup>, член-кор. НАН і НАМН України, д.мед.н., професор,

**І.Ф. Бєленічев**<sup>3</sup>, д.біол.н., професор, завідувач кафедри,

**Н.О. Горчакова**<sup>4</sup>, д.мед.н., професор,

**А.С. Свінціцький**<sup>5</sup>, д.мед.н., професор, завідувач кафедри,

**М.І. Загородний**<sup>5</sup>, д.мед.н., доцент,

**Б.С. Бурлака**<sup>6</sup>, к.фарм.н., доцент,

<sup>1</sup> кафедра клінічної лабораторної діагностики Національного фармацевтичного університету, м. Харків,

<sup>2</sup> кафедра фармакології, патологічної фізіології, клінічної фізіології

Київського медичного університету УАНМ,

<sup>3</sup> кафедра фармакології і медичної рецептури Запорізького державного медичного університету,

<sup>4</sup> кафедра фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ,

<sup>5</sup> кафедра внутрішньої медицини № 3 Національного медичного університету

імені О.О. Богомольця, м. Київ,

<sup>6</sup> кафедра технології ліків Запорізького державного медичного університету

**Ц**ереброваскулярні захворювання є складною медико-соціальною проблемою. Важливе місце серед цереброваскулярних хвороб (ЦВХ) належить «гострим порушенням мозкового кровообігу», які включають гострий церебральний інсульт і транзиторні ішемічні атаки. Найчастішим видом гострого церебрального інсульту є *ішемічний інсульт* (інфаркт мозку, або гостра церебральна ішемія) [1, 2]. Кількість хворих з ішемічними інсультами (ІшІ) в багатьох економічно розвинутих країнах невинно зростає, вони потребують термінового спеціалізованого лікування в стаціонарі та подальшої реабілітації; при цьому відзначають тривалу тимчасову непрацездатність із високим рівнем інвалідизації [3, 4].

**Чим тяжчим є перебіг інсульту, тим необхіднішою в комплексі лікувальних заходів стає комплексна патогенетична терапія, яка в ранні терміни лікування (протягом «терапевтичного вікна») включає реперфузію, комбіновану**

**нейропротекцію, стимуляцію репаративних процесів та компоненти вторинної профілактики [5-8].**

Розвиток нейродегенеративних змін та тяжкість стану пацієнтів з ІшІ залежать від ушкоджувальної дії ішемії, яка визначається глибиною та тривалістю зниження мозкового кровообігу. Ступінь вираженості функціонально-метаболічних змін у тканині головного мозку прогресивно зменшується від центру до периферії пошкодження, що пов'язано з агресивним впливом активізованих ішемією клітин глії на життєздатні нейрони пенумбри<sup>1</sup> шляхом вторинного пошкодження мозку [9, 10]. Серед механізмів вторинного пошкодження тканини мозку особливе значення мають реакції локального запалення навколо зони «ядра» інфаркту, а саме різке збільшення вмісту прозапальних медіаторів – *цитокінів* [11, 12].

**Роль цитокінів у механізмах розвитку цереброваскулярних захворювань.** Цитокіни є необхідними трансмітерами міжклітинної взаємодії

<sup>1</sup> Пенумбра (від лат. *paene* – майже і *umbra* – тінь, букв. – півтінь) – зона нефункціонуючих і частково пошкоджених клітин, які проте зберігають життєздатність, навколо вогнища первинного ушкодження (*прим. ред.*).

в нормі і при патології, вони утворюють цілісну систему взаємодіючих елементів – цитокинову мережу комунікативних сигналів між клітинами імунної системи й клітинами інших органів і тканин. Секретовані або експресовані цитокини зв'язуються зі специфічними рецепторами на цитоплазматичній мембрані клітин-мішеней, викликаючи тим самим каскад реакцій, що веде до індукції, посилення або пригнічення активності регульованих ними генів.

Цитокинам властиві дві спільні ознаки:

- один цитокин часто викликає секрецію клітиною-мішенню іншого цитокину (феномен цитокинового каскаду);
- власні цитокини клітини часто змінюють характер взаємодії інших цитокинів на ту ж саму клітину.

Ця взаємодія може бути синергічною, додатковою, інгібувальною або навіть призводити до формування нового ефекту, невідомого для жодного з окремо взятих цитокинів [13, 14].

За біологічною активністю цитокини поділяють на групи, межі між якими умовні [15]:

- **інтерлейкіни** (фактори взаємодії лейкоцитів);
- **інтерферони** (цитокини з протівірусною активністю);
- **фактори некрозу пухлин** (цитокини з цитотоксичною активністю);
- **колоніестимулювальні фактори** (гемопоетичні цитокини – хемокіни).

На думку N. Bornstein (2008 р.), при ІшІ вогнище ураження складається з *ядра* (клітин, які померли протягом кількох хвилин або годин із моменту розвитку інсульту) та зони *ішемічної півтіні* (пенумбри), для якої ризик загибелі клітин підвищений, але їх можна зберегти у разі своєчасно розпочатого лікування. Через 30 хвилин після інсульту нервові клітини в зоні пенумбри ще життєздатні, однак через 3 години живих клітин у ній не виявляють. На тлі наростаючої ішемії зниження кровотоку супроводжується формуванням мітохондріальної дисфункції та енергетичного дефіциту, розвитком глутаматкальцієвого каскаду, дестабілізацією клітинних мембран та загибеллю нейронів [16]. Основними механізмами загибелі нейронів у зоні пенумбри є глутаматна ексайтотоксичність; ішемія, запалення та реперфузійне ушкодження; програмована загибель клітин (процеси, подібні до апоптозу). У формуванні та прогресуванні цих процесів важливу роль відіграють взаємопов'язані компоненти імунної та інших систем, а саме прозапальні цитокини, продукти перекисного окиснення ліпідів і білків, оксид азоту, ендотелін-1 і чинники апоптозу [17]. Встановлено кореляційні зв'язки вмісту деяких цитокинів із тяжкістю клінічних проявів у хворих на цереброваскулярні захворювання [18].

**Цитокини – ішемія/гіпоксія.** Гіпоксичні стани є основою або супутнім фактором патогенезу багатьох захворювань, зокрема ЦВХ. При цьому доставка кисню до тканин знижується до рівня, недостатнього для підтримання метаболізму, структури

та функції клітин. Доведено, що навіть у віддалених від ішемічного «ядра» ділянках виявляють «неврологічні депресії», тобто вторинні зміни мозкового кровотоку й енергетичного метаболізму клітин мозку. Особливе значення серед механізмів вторинного пошкодження тканини мозку мають реакції локального запалення навколо зони «ядра» інфаркту, індуковані різким підвищенням рівнів прозапальних цитокинів. Першим із прозапальних цитокинів у зоні ішемії мікроглія продукує інтерлейкін-1 (IL-1), при взаємодії якого з рецепторами активуються ядерні фактори транскрипції AP-1 і NK-kF та змінюється поведінка клітин-мішеней, розвивається гострофазова клітинна відповідь, метаболічна дисфункція і експресія генів раннього реагування.

**Продукція IL-1 є основним активуючим сигналом для індукції інших прозапальних цитокинів та стимуляції астроцитів до продукції потенційних нейротоксичних речовин (NO, метаболітів арахідонової кислоти). Розвивається трофічна дизрегуляція, що призводить до біохімічної та функціональної дедиференціації нейронів і запуску патобіохімічних каскадів некрозу/апоптозу [19, 20].**

Одним із механізмів пошкодження та загибелі нейронів є вільнорадикальний. Мозок містить величезну кількість ліпідів та аскорбату, процеси окиснювального метаболізму в ньому надзвичайно інтенсивні, що зумовлює можливу активацію перекисного окиснення ліпідів. При цьому активність ферментних антиоксидантів у головному мозку значно нижча, ніж в інших тканинах, що підвищує ризик розвитку окиснювального стресу з утворенням активних форм кисню, які ініціюють процеси перекисного окиснення ліпідів мембран, прямої деструкції нуклеїнових кислот і окиснювальної модифікації білків. Рівні активних форм кисню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окиснювальної модифікації білків зростають, що веде до ушкодження мембран та клітинних структур; синтезу транскрипційного чинника, індукованого при гіпоксії (HIF), та активації HIF-1-залежних генів; синтезу прозапальних цитокинів і формування хибного кола вторинних ушкоджень [21, 22].

**Важливою ланкою постішемічного ушкодження мозку є активація системи оксиду азоту, яка задіяна у розвитку й регуляції багатьох фізіологічних та патологічних процесів організму, зокрема нейродеструкції.**

Оксид азоту утворюється шляхом окиснення L-аргініну за наявності ферменту NO-синтази (NOS) – нейрональної (nNOS), індукцибельної (iNOS) або ендотеліальної (eNOS). За активністю iNOS у сотні разів перевищує eNOS і зумовлює гіперпродукцію оксиду азоту до цитотоксичних рівнів протягом кількох днів із моменту індукції. Гіпоксія при ІшІ впливає на експресію генів NOS, індуюючи фактори транскрипції – HIF-1, HIF-2 і NF-κB, що стимулює активність і експресію всіх трьох ізоформ NOS. Безпосередньо IL-1β активує експресію iNOS, що призводить до гіперпродукції NO і токсичного ефекту його надлишку. Концентрація NO збільшується з перших хвилин ішемії, досягаючи максимуму на 1-3 добу як в ядрі ішемії, так і в зоні пенумбри. Пряма взаємодія NO з металами активних центрів ферментів та непряма взаємодія нітрозонію (катіону NO<sup>+</sup>) з білками і ДНК призводять до фрагментації нуклеїнових кислот та пригнічення активності мітохондріальних ферментів, падіння заряду мітохондрій, формування енергетичного дефіциту; може ініціювати загибель клітин шляхом некрозу або апоптозу [23, 24].

**В умовах церебральної гіпоксії різке підвищення рівнів прозапальних цитокинів (насамперед IL-1) призводить до послідовного розгортання цитокинового каскаду, продукції нейротоксичних речовин, розвитку гострофазової клітинної відповіді, активації окиснювального і нітрузувального стресів, метаболічної дисфункції, що зумовлює нейродеструкцію та розвиток постінсультних неврологічних дефіцитів.**

**Цитокини – запалення.** Загальновизнаною є роль запалення у розвитку багатьох неврологічних захворювань, зокрема церебральної ішемії. За сучасними уявленнями, характер імунної відповіді та особливості розвитку запалення при ЦВХ залежить від переважної активації субпопуляцій Т-лімфоцитів та синтезу ними цитокинів різних типів [25, 26]. Водночас існують переконливі докази важливої ролі медіаторів запалення у нейрорепарації і відновленні неврологічних функцій.

Імунокомпетентним компартментом у центральній нервовій системі (ЦНС) є *мікроглія*, яка після активації ішемією продукує прозапальні речовини, підвищення рівнів яких, навіть незначне, призводить до прогресування атерогенезу і хронізації церебральної ішемії з формуванням енцефалопатії. При ІшІ концентрація прозапальних цитокинів (IL-1, IL-6, IL-8) різко підвищується, що супроводжується активним розвитком локального запалення з активацією судинного ендотелію та індук-

цією на його поверхні молекул міжклітинної адгезії (ICAM-1). Потужними регуляторами-індукторами молекул лейкоцитарно-ендотеліальної адгезії є IL-1β і фактор некрозу пухлин α (TNF-α), які активують IL-8 та відіграють вирішальну роль у запуску міграції лейкоцитів із судинного просвіту в зону фокальної ішемії з інфільтрацією ними пошкодженої тканини. Дослідження з радіоактивною міткою виявили велику кількість поліморфно-ядерних лейкоцитів у ділянках мозку зі зниженою перфузією вже через 6-12 годин після дебюту інсульту. Лейкоцити, що надійшли з системного кровообігу – нейтрофіли, потім моноцити, – посилюють руйнування мозкових клітин за рахунок своїх токсичних продуктів, фагоцитарної дії та імунних реакцій [27, 28].

Ендотелій зазнає низку істотних змін – структурні пошкодження, функціональну перебудову, набуття гемостатичних прокоагуляційних властивостей, збільшення проникності базальної мембрани і трансендотеліальних контактів для нейтрофілів і рідини на тлі пригнічення абсорбції. Це сприяє формуванню цитотоксичного набряку глії і нейронів, проникненню токсичних речовин із судинного русла в мозкову тканину на тлі триваючих окисдантних і прокоагуляційних реакцій, що призводить до загибелі життєво важливих нейронів із формуванням ядра інсульту. Експериментально доведено, що введення в шлуночки мозку щурів рекомбінантного людського IL-1β після оборотної тимчасової оклюзії середніх мозкових артерій дозозалежно збільшувало набряк мозку, розмір «ядра» інфаркту та кількість нейтрофілів у зоні ішемії [29, 30].

**Цитокини є ключовими факторами формування при ІшІ локальної запальної реакції і вторинного пошкодження мозкової тканини в зоні пенумбри – активації ендотелію з прогресуванням ендотеліальної дисфункції, індукції молекул міжклітинної адгезії, інтенсивної лейкоцитарної інфільтрації, що сприяє формуванню цитотоксичного набряку глії і нейронів та проникненню токсичних речовин із судинного русла в мозкову тканину.**

**Цитокини – некроз/апоптоз.** В умовах дефіциту кисню при ІшІ енергетичний дефіцит і окиснювальний стрес активують термінові регуляторні компенсаторні механізми, індуюють експресію генів раннього реагування і активують механізми патологічної клітинної смерті (некроз) або програмованої загибелі клітин (апоптоз). *Некроз* призводить до пасивної смерті клітин без витрати енергії, при цьому вивільнення клітинного вмісту

спричинює загибель інших клітин, супроводжується продукцією прозапальних цитокінів і розвитком вторинного запалення. Апоптоз відіграє позитивну фізіологічну роль, уражає окремі клітини; як правило, не активує запалення; проте патологічні процеси, що асоціюються з інсультом, є вкрай негативними. С. Wiesser et al. провели ряд спостережень, результати яких свідчать про участь апоптозу у відстроченій нейрональній смерті при транзиторній ішемії переднього мозку щура, а R. Sadoul et al. зареєстрували апоптоз у ядрі фокальної ішемії мозку. Сучасні методи діагностики дали змогу встановити, що «доформування» ішемічного інсульту триває 48-72 години з моменту розвитку інсульту (можливо, й довше) з урахуванням функціонуючих механізмів апоптозу та місцевого запалення на тлі набряку мозку, що зберігається [31, 32]. Таким чином, апоптоз як генетично запрограмований універсальний механізм загибелі клітин бере участь у гострій і відстроченій загибелі нейронів при церебральній ішемії.

На ранніх стадіях ішемії мозку різні механізми uszkodження клітини, зокрема надмірне підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію, включають неспецифічну реакцію геному нейрона, що викликає експресію генів раннього реагування. За наявності нейротрофінів<sup>2</sup> генна програма розгортається за антиапоптозними механізмами, спрямованими на виживання клітини. В умовах дефіциту нейротрофінів і порушення білкового синтезу активуються апоптозні гени, що реалізують суїцидну програму. Таким чином, в організмі існує баланс між генетичними програмами виживання і смерті, регуляція якого здійснюється передусім системою трофічного забезпечення мозку. В умовах гострої мозкової гіпоксії підвищення продукції IL-1 із подальшим формуванням цитокінового каскаду супроводжується надмірною продукцією вільних радикалів, що додатково погіршує трофічний стан нейронів у ділянці ішемічного uszkodження. Експресія гена IL-1 у гліальних клітинах викликає вторинну експресію гена iNOS, що веде до гіперпродукції NO, інгібування білків-ферментів дихального ланцюга мітохондрій та циклу Кребса, виснаження запасів нікотинамід-аденіндинуклеотиду і аденозинтрифосфату (АТФ), загибелі нейронів шляхом некрозу або апоптозу. Крім того, порушення кисневого режиму тканин, трансмітерний автокоідоз (дисбаланс), порушення акумуляції Ca<sup>2+</sup> мітохондріями, пошкодження мембрани мітохондрій надлишковими рівнями NO і активними формами кисню посилюють відкриття пор та вивільнення апоптогенних білків із пошкоджених мітохондрій [33, 34].

У геномі будь-якої клітини є гени, що реагують на дію індукторів та інгібіторів апоптозу, активуючи або блокуючи цей процес. Генами-активаторами апоптозу при ЦВХ є p53, Вах, Bcl-xS, c-fos, c-jun, p75NGFR. Апоптоз викликають активовані вну-

трішньоклітинні протеази (каспази) [24]. У нормі каспази є неактивними проензимами; тригерами виступають глутамат і вільні радикали, які запускають реакції автокаталізу (самоактивації) каспаз. Розщеплюючи як ядерні, так і цитоплазматичні білкові структури нейрона, каспази (зокрема IL-1 $\beta$ -конвертована протеаза, або каспаза-1) беруть участь в ефекторній і деградаційній фазах апоптозу, що є основним фактором uszkodження при церебральній ішемії. Вважається, що прозапальні IL, TNF та інтерферони стимулюють апоптоз [35, 36]. Роль цитокінів в індукуванні процесів некрозу/апоптозу та прогресуванні постінсультних неврологічних дефіцитів неоднозначна і потребує подальшого вивчення. Розкриття участі цитокінів у механізмах апоптозу передбачає широкі можливості нейропротективної терапії, а саме управління процесами виживання і регуляції клітинної смерті.

**Перспективи нейропротективної імунотерапії з використанням цитокінових препаратів.** Первинна нейропротекція спрямована на переривання швидких механізмів некрозу клітин (реакції глутаматкальцієвого каскаду та вільнорадикального uszkodження), вторинна – на зменшення вираженості «віддалених наслідків ішемії» (блокада прозапальних цитокінів, молекул клітинної адгезії, гальмування прооксидантних ферментів, посилення трофічного забезпечення, тимчасове гальмування апоптозу). Одним із перспективних напрямів вторинної нейропротекції вважають фармакологічну інтервенцію в нейродеструктивний каскад на рівні регуляції дисбалансу цитокінів та модуляції їх про-/протизапальних ефектів.

**З метою зниження концентрації прозапальних цитокінів – їх знешкодження або блокування ефектів – можливе використання природних інгібіторів, нейтралізуючих моноклональних антитіл (МКА) до цитокінів та розчинних рецепторів (sR) цитокінів [37]. Ці засоби цитокінотерапії використовуються в терапії багатьох захворювань внутрішніх органів – автоімунних, інфекційних, пухлинних та інших, щодо яких визначено роль цитокінів у ключових патофізіологічних процесах.**

В умовах церебральної гіпоксії прозапальні цитокіни (IL-1, TNF, IL-6) беруть участь у розвитку цитокінового каскаду та формуванні всього ланцюгу молекулярних та патобіохімічних змін, які ведуть до загибелі нейронів шляхом некрозу або апоптозу. Тому розуміння особливостей функціо-

<sup>2</sup> Загальна назва секретованих білків, що підтримують життєздатність нейронів, стимулюють їхній розвиток і активність (прим. ред.).

нування саме цих цитокінів дасть змогу модулювати їх ефекти та застосовувати ефективну імунокорегувальну нейропротекцію [38, 39].

**Інтерлейкін-1** задіяний практично в усіх етапах імунної відповіді:

- активує цитотоксичні Т-лімфоцити і NK-клітини (природні кілери);
- впливає на диференціювання Т- і В-лімфоцитів та інших імунокомпетентних клітин;
- бере участь у регуляції продукції ІЛ-2, -4, -6, -8, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактора (GM-CSF) та інших цитокінів.

Активними інгібіторами продукції ІЛ-1 є ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-12, TNF- $\alpha$ . У сімейство інтерлейкіну-1 об'єднують ІЛ-1 $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$  (два різних білка з практично ідентичною активністю, які мають близьку молекулярну масу (15-17 кД), але відрізняються за ізоелектричною точкою), рецепторний антагоніст ІЛ-1 (ІЛ-1Ra), рецептори ІЛ-1R, ІЛ-18, ІЛ-33 та інші. ІЛ-1 $\alpha$  синтезується відразу в активній формі, функціонує у вигляді мембранної форми (більшою мірою), внутрішньоклітинного регулятора та розчинного біологічно активного цитокіну, тривалість його життя – 15 годин. Основною секреторною формою є ІЛ-1 $\beta$  (активний протягом 2,5 години), попередник якого перетворюється на зрілу біологічно активну форму під час посттрансляційного процесингу під впливом каспази-1 (ІЛ-1 $\beta$ -конвертованої протеази). Клітини-мішені ІЛ-1 експресують рецептори трьох типів: загальні для  $\alpha$ - і  $\beta$ -форм ІЛ-1 рецептори ІЛ-1 I і II типів та аксесорний білок рецептора ІЛ-1, які унікальні за своєю структурою та не мають аналогів серед інших цитокінів. Біологічна дія ІЛ-1 реалізується після зв'язування з цими специфічними мембранними рецепторами [40, 41].

У ЦНС представлено обидві форми ІЛ-1 ( $\alpha$  та  $\beta$ ). ІЛ-1 $\beta$ , який продукується моноцитами, клітинами мікроглії, астроцитами, ендотеліальними клітинами судин мозку, залучений до формування в ЦНС запальних реакцій. За нормальних фізіологічних умов ІЛ-1 також експресується в ЦНС і здійснює взаємодію між нервовою та імунною системами. У ЦНС здорових людей його продукцію виявлено в мікроглії та астроцитах гіпокампа, судинних сплетінь, мозочка та міжчасткових перетинках. Експресію рецепторів ІЛ-1 за нормальних умов виявлено в різних структурах ЦНС; щільність експресії є максимальною в гіпокампі. При ІшІ ІЛ-1 $\beta$  найбільш інтенсивно продукується в зоні ядра та пенумбри. За цієї патології рівні ІЛ-1 стрімко зростають та залишаються підвищеними протягом кількох днів після розвитку інсульту, що свідчить про інтенсивність запальних реакцій і їхню роль у процесах нейродеструкції. У госпіталізованих через 6-12 годин від початку інсульту пацієнтів спостерігаються вищі рівні ІЛ-1 $\beta$  і TNF $\alpha$ ,

при цьому порушені неврологічні функції клінічно відновлюються гірше, ніж у пацієнтів, які почали лікування в перші 2-5 годин після ІшІ [42, 43].

Продукцію ІЛ-1 контролює його природний інгібітор – рецепторний антагоніст ІЛ-1 – ІЛ-1Ra. Встановлено, що вже в перші 2-5 годин захворювання у плазмі крові й спинномозковій рідині хворих із гострим ішемічним інсультом збільшуються концентрації ІЛ-1 $\beta$  і TNF $\alpha$  на тлі недостатності протизапальних (зокрема ІЛ-1Ra) і трофічних факторів. Тому співвідношення продукції ендогенних ІЛ-1 та ІЛ-1Ra має вирішальне значення для розвитку запалення і визначає тип імунної відповіді, за яким відбувається постішемічне ушкодження [44, 45].

Аналогічний дисбаланс цих цитокінів виявлено при розвитку ряду аутоімунних захворювань (ревматоїдний артрит (РА) та інші), коли концентрація ІЛ-1 значно підвищується на фоні недостатньої продукції його рецепторного антагоніста. Для лікування пацієнтів із РА використовують рекомбінантний антагоніст рецепторів ІЛ-1 – препарат анакінра, схвалений FDA<sup>3</sup>. У таблиці наведено характеристику біологічно активних речовин (БАР) / імуномодуляторів протизапальної дії, які використовуються в клінічній практиці або перебувають на етапі досліджень.

Так, анакінра (рекомбінантний неглікозильований антагоніст ІЛ-1Ra людини) у клінічних умовах виявився активнішим, ніж антагоністи TNF- $\alpha$ , за здатністю знижувати інтенсивність місцевого запального процесу та запобігати прогресуванню деструкції хряща і субхондральної кістки; при використанні жорсткіших критеріїв (ACR50 і ACR70)<sup>4</sup> було виявлено достовірні відмінності на користь застосування більш високих доз анакінри в порівнянні з плацебо. Важливо, що при використанні препарату в зростаючих дозах не спостерігали пропорційного підвищення частоти виникнення побічних ефектів (включаючи інфекційні ускладнення), відмов від лікування й летальних випадків. Автори дійшли висновку про сприятливий профіль безпеки та ефективності препарату навіть при використанні відносно високих доз. Водночас недостатньо тривалий період широкого клінічного застосування анакінри диктує необхідність продовження досліджень у цьому напрямі. Крім того, препарат дозволений до застосування лише в осіб віком від 18 років із помірним або тяжким РА [46, 47]. Нині тестуються нові терапевтичні підходи, покликані нейтралізувати активність ІЛ-1, – використання специфічних антитіл до ІЛ-1, ІЛ-1 TRAP (Fc-фрагмент рецептора ІЛ-1), а також до відповідних рецепторів. Проте клінічні результати їх застосування залишаються не досить визначеними і вимагають подальшого уточнення в умовах спеціально спланованих рандомізованих контрольованих досліджень (РКД) [48].

<sup>3</sup> Food and Drug Administration – Управління з контролю якості продуктів харчування та лікарських препаратів, США (прим. ред.).

<sup>4</sup> Критерії поліпшення стану пацієнта, розроблені Американською колегією ревматологів (прим. ред.).

**Таблиця.** Клініко-фармацевтична характеристика біологічно активних речовин (БАР) / імуномодуляторів протизапальної дії

Молекулярна мішень	Напрямок імунотерапії	Назва БАР фармакологічна/торгова	Опис молекули	Механізм дії	Дозвіл на клінічне застосування / фаза клінічних досліджень при	
					РА	Інших захворюваннях
IL-1	Специфічний антагоніст IL-1R	Анакіра/Кінерет (Kineret)	Рекомбінантні людські IgG1 – моноклональні антитіла, специфічні для IL-1R	Конкурентне та селективне інгібування зв'язку IL-1 зі специфічним рецептором I типу (IL-1RI), внаслідок чого досягається зниження інтенсивності прозапальної активації, реверсія симптомів та обмеження прогресування запалення	Резервується для пацієнтів із неадекватною відповіддю на один або кілька DMARD	1-6 міс., типова пневмонія
	МКА рекомбінантні людини	AMG 108/ –	Рекомбінантні людські IgG1-МКА, специфічні для IL-1β	Інгібування ефектів прозапального IL-1β	II фаза клінічних досліджень	–
TNF-α	МКА химерні	Інфліксимаб/Ремикейд (Remicade)	Химерні IgG1-каппа МКА, специфічні до TNF-α	Нейтралізація TNF-α та інгібування його зв'язку зі специфічними мембранними рецепторами, що обмежує продукцію прозапальних цитокінів Специфічне зв'язування та інактивація TNF-α з подальшим блокуванням його взаємодії з поверхневими клітинними рецепторами TNF p55 і p75	Рекомендований у комбінації з метотрексатом при неадекватній відповіді на стартове лікування останнім	Хвороба Крона у дорослих та дітей, виразковий коліт, анкілозуючий спонділоартроз, псоріатичний артрит, псоріаз
	sR	Етанерцепт/Енбрель (Enbrel)	Солюбілізований p75 TNF-α-β-зв'язуючий протеїн (sTNFR-Ig)	Інгібування зв'язування TNF-α і TNF-β зі специфічними мембранними рецепторами, що знижує вираженість прозапальної активації та інтенсивність імунної відповіді	Рекомендований для монотерапії та в комбінації з метотрексатом	–
IL-6	sR	Тоцилізумаб/Актепра (Actemra)	Рекомбінантні людські IgG1-МКА, специфічні для IL-6R	Інгібування рецептора прозапального IL-6	III фаза клінічних досліджень	–

Примітки: РА – ревматоїдний артрит; IL – інтерлейкін; DMARD – disease-modifying anti-rheumatic drug (протиревматичний лікарський засіб, що модифікує перебіг захворювання); МКА – моноклональні антитіла; TNF – фактор некрозу пухлин.

Аналіз застосування рекомбінантних аналогів цитокінів у хворих виявив залежність клінічної ефективності та вираженості побічних реакцій від індивідуальних особливостей пацієнтів – характер запальної відповіді залежав від функціонального поліморфізму цитокінових генів. Отримані результати дають змогу припустити, що для носіїв високопродукуючих варіантів генів IL-1RN додаткове введення їхніх рекомбінантних аналогів не матиме значущих результатів, може супроводжуватися розвитком побічних реакцій, а в деяких випадках активізувати патологічний процес. Аналогічно, у носіїв високопродукуючих варіантів генів IL-1RN\*2 ефект від введення рекомбінантних

аналогів IL-1Ra або інших протизапальних цитокінів виявиться менш вираженим, ніж у пацієнтів із «прозапальним» генотипом [49, 50].

**Фактор некрозу пухлин α (TNF-α)**, він же «кахектин», – виконує регуляторні та ефекторні функції в процесах імунної відповіді та запалення. Основні прояви біологічної активності TNF-α: вибіркова цитотоксичність щодо деяких пухлинних клітин, пригнічення синтезу ключового ферменту ліпогенезу ліпопротеїнази, участь у регуляції імунної відповіді і запалення. Він входить до групи прозапальних цитокінів і виконує важливі функції в період запуску запалення: активує ендотелій, сприяє адгезії лейкоцитів до ендотелію за рахунок

індукції експресії на ендотеліальних клітинах адгезійних молекул і подальшої трансендотеліальної міграції лейкоцитів у вогнище запалення, активує лейкоцити (гранулоцити, моноцити, лімфоцити), індукує продукцію інших прозапальних цитокінів: IL-1, IL-6, IFN, GM-CSF, які мають синергічну з TNF- $\alpha$  дію. При цьому встановлено тісний взаємозв'язок активності TNF- $\alpha$  і ступеня продукції прозапальних цитокінів [51, 52].

TNF- $\alpha$  продукується обома типами Т-хелперів, тому може відігравати як захисну, так і ушкоджувальну роль. У ЦНС основними продуцентами TNF- $\alpha$  є активовані макрофаги, астроцити, мікроглія та активовані Т-лімфоцити; рецептори TNF знайдено на астроцитах. У пацієнтів з ІшІ в зоні ішемії виявлено транзиторне підвищення експресії TNF- $\alpha$  в досить високих концентраціях уже на ранніх стадіях захворювання. Це зумовлює реалізацію широкого спектра патологічних процесів – активацію ендотеліоцитів і ампліфікацію хемокінів, що призводить до субендотеліальної акумуляції лейкоцитів; формування дисфункції ендотелію; погіршення ефективності мікроциркуляції. TNF- $\alpha$  індукує продукцію інших цитокінів у мікроглії та астроцитах, експресію білка Fas та Fas-ліганду в різних клітинах. Прозапальна дія на ендотеліальні клітини мозку викликає збільшення експресії молекул адгезії судинного ендотелію (VCAM-1) та внутрішньоклітинних молекул адгезії (ICAM-1). Це призводить до підвищення рівня розчинних VCAM-1, блокування адгезії клітин і метаболічних порушень [53].

Клінічні дослідження антитіл до TNF- $\alpha$  виявилися успішними. У 1992 р. в умовах відкритого випробування вперше вдалося продемонструвати позитивний вплив химерних людських антитіл, специфічних до TNF- $\alpha$  (інфліксимаб), у 20 пацієнтів із РА. Препарат сприяв реверсії клінічних симптомів захворювання, значною мірою знижував рівень С-реактивного протеїну в плазмі крові і зменшував швидкість осідання еритроцитів. Ці результати підтверджено в масштабних плацебо-контрольованих клінічних дослідженнях, в яких інфліксимаб використовували в поєднанні з метотрексатом, що дало підстави FDA рекомендувати інфліксимаб для лікування пацієнтів із РА. Надалі поряд з інфліксимабом FDA дозволила клінічне застосування ще кількох лікарських засобів: етанерцепту, що інгібує зв'язування TNF- $\alpha$  і TNF- $\beta$  зі специфічними мембранними рецепторами, і адаліумабу, що сприяє інактивації TNF- $\alpha$  з подальшим блокуванням взаємодії з поверхневими клітинними рецепторами TNF p55 і p75. Окрім того, інфліксимаб і адаліумаб у поєднанні з метотрексатом сприяли деякому підвищенню частоти розвитку серйозних інфекційних ускладнень. Використання більш «жорстких» критеріїв ACR виявило деякі переваги етанерцепту [54, 55]. Проте результати багатьох контрольованих випробувань показують, що досить значна частина пацієнтів із РА не відповідає на лікування антагоністами TNF- $\alpha$ . При

цьому в процесі терапії часто виникає індукована толерантність до біологічно активних препаратів, хоча існують і протилежні спостереження [56]. Усе це диктує нагальну необхідність пошуку нових мішеней для медикаментозної корекції ефектів TNF- $\alpha$  при ІшІ.

**Інтерлейкін-6 (IL-6)** уперше було виявлено у 1986 році як фактор регуляції В-клітинної активності. Нині встановлено, що IL-6 має також плейотропні властивості, що включають не тільки регуляцію Т- і В-клітинної кооперації, активності макрофагів, остеокластів, хондроцитів, ендотеліоцитів, але й широкий спектр ефектів щодо модуляції кістковомозкового кровотворення. Дія IL-6 реалізується після взаємодії з двома компонентами специфічного гетеродимерного рецептора (gp130 і IL-6R). IL-6 є прозапальним цитокіном із двома напрямками дії. З одного боку, він інгібує продукцію макрофагами прозапальних цитокінів, з іншого – індукує продукцію гострофазових білків (які активують синтез кортикостероїдів), сприяє активації Т-лімфоцитів антигенпрезентуючими клітинами, посилює В-клітинну проліферацію та індукує утворення імуноглобулінів, стимулює гемопоез та утворення тромбоцитів [57, 58].

За нормальних умов IL-6 продукується в ЦНС фолікулярно-зірковими клітинами та клітинами астроглії переднього гіпофізу. *In vitro* в культурі клітин мікроглії людини виявлено високу спонтанну продукцію IL-6 (без додаткової стимуляції). Як фактор пізньої стадії диференціювання В-клітин у плазматичні клітини IL-6 експресується в ЦНС без зв'язку з пенетрацією гематоенцефалічного бар'єру клітинами, що залучені в запалення. У вогнищах постішемичного запалення експресується в основному астроцитами (10-17%) та меншою мірою макрофагами (до 2%). В білій речовині мозку та в зоні пенумбри IL-6 експресується здебільшого астроцитами [59].

Теоретичну можливість обмеження прозапальної активації, поліпшення основних проявів РА та клінічного статусу хворих після цитокінової імунокорекції було доведено результатами РКД щодо використання толізумабу – препарату, який містить людські моноклональні антитіла, специфічні для рецепторів IL-6. Вони показали високу ефективність толізумабу щодо реверсії активності захворювання і запобігання формуванню деструктивних змін у разі резистентності РА до традиційних DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drug – протиревматичних лікарських засобів, що модифікують перебіг захворювання) [60, 61] (див. **таблицю**). Водночас можливу токсичну дію зазначеної стратегії лікування ще недостатньо чітко визначено – передбачається, що препарат може мати деякі обмеження щодо кардіоваскулярної безпеки, тому слід дочекатися завершення масштабних РКД.

**Інші цитокінові препарати в нейропротекції.** Апоптоз є активним процесом саморуйнування клітини, для якого потрібен білковий синтез.

Це підтверджено в досліджах *in vivo* щодо запобігання смерті нейронів за допомогою інгібіторів білкового синтезу. Значну роль у розвитку процесів ішемічного пошкодження тканини мозку відіграє недостатність трофічного забезпечення, що впливає на вибір механізмів некротичних або репаративних реакцій. Природною захисною реакцією мозку в перші хвилини ішемії є синтез трофічних факторів і рецепторів до них. При швидкій і активній експресії генів, що кодують нейротрофіни (фактори росту), ішемія мозку може тривало не призводити до інфарктних змін. У випадку ж формування пошкодження високий рівень трофічних факторів забезпечує регрес неврологічного дефіциту навіть при збереженні морфологічного дефекту, що його викликав. Отже, модуляція апоптозу можлива шляхом застосування препаратів із вираженими нейротрофічними і ростовими властивостями, що підтверджено в експерименті ефектом збереження CA1-нейронів шляхом введення великих доз BDNF (brain-derived neurotrophic factor – фактора росту, отриманого з головного мозку) після транзиторної ішемії переднього мозку [62, 63]. Фактори росту – ендogenous поліпептиди – є ідеальними претендентами для лікування інсульту, оскільки мають нейропротективні, репаративні і проліферативні властивості. Але значні розміри поліпептидної молекули нейротрофінів утруднюють їх проникнення через гематоенцефалічний бар'єр, що обмежує можливості їх терапевтичного застосування. Останнім часом значна увага приділяється вивченню властивостей низькомолекулярних нейропептидів. Ці сполуки вільно проникають через гематоенцефалічний бар'єр, чинять багатосторонню дію на ЦНС. Однак щодо абсолютної більшості таких засобів у міжнародних клінічних випробуваннях поки що не отримано переконливих результатів ні при інсульті, ні при травмах головного мозку, ні при інших захворюваннях, що загрожують ушкодженням нейронів [64, 65].

Новим напрямом пошуку модулаторів апоптозу є експерименти з використанням інсуліноподібного фактора росту 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) і фактора росту з тромбоцитів (platelet-derived growth factor, PDGF). Доведено, що в умовах *in vitro* IGF-1 у концентрації 50-500 нг/мл або PDGF у концентрації 100 нг/мл знижують частку апоптотичних клітин у зразках тканин, отриманих із різних ділянок міжхребцевих дисків [66]. Цитокіни також здатні чинити опосередкований вплив на апоптоз. Так, дія людського інтерферону пов'язана з його здатністю індукувати на Т-клітинах експресію рецептора Fas, що посилює їхню Fas-залежну загибель і призводить до вираженого зниження кількості як CD8+, так і Т-лімфоцитів [67].

**Терапевтичний ефект рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 при експериментальному церебральному інсульті.** У патогенезі гострих порушень мозкового кровообігу важливе місце посідають різноманітні ланки каскаду нейродеструкції, пов'язані між собою та детерміновані в часі.

**В осередку гіпоксії/ішемії активуються клітини ендотелію, лейкоцити, макрофаги, які продукують цитокіни, насамперед інтерлейкіни [68]. Розвивається «цитокіновий каскад» – гіперпродукція прозапальних і відносний дефіцит протизапальних цитокінів і ростових факторів [13, 14]. Передусім підвищується продукція IL-1, який є головним медіатором розвитку місцевої запальної реакції та гострофазової відповіді на рівні організму, координує «цитокіновий каскад» – співвідношення про- та протизапальних медіаторів, що індукує та підтримує запалення в осередку гіпоксії/ішемії, веде до змін мікроциркуляції, гематоенцефалічного бар'єру та віддаленої загибелі нейронів [69].**

Експресія IL-1 викликає синтез рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 (IL-1Ra), який інгібує дію IL-1 шляхом конкурентного зв'язування його специфічних рецепторів мембранного типу I та перешкоджає взаємодії рецептора IL-1 з акцесорним (додатковим) білком, що призводить до відсутності проведення сигналу всередину клітин [30, 69].

Отже, важливою перспективною ланкою ефективного захисту тканини мозку в комплексній терапії цереброваскулярних захворювань є застосування нових церебропротективних цитокінових препаратів інтерлейкінового ряду [5, 70]. Ми дослідили вплив рекомбінантного IL-1Ra на динаміку постгіпоксичних змін у тканинах головного мозку щурів з експериментальним фокальним інсультом, а саме функціональну активність мітохондрій та тіол-дисульфідної системи. Препаратом порівняння обрано тіотриазолін – відомий цитопротектор метаболічної дії, який широко застосовується при лікуванні різних захворювань у кардіології, неврології та клініці внутрішніх хвороб.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (IL-1Ra) отримано в Санкт-Петербурзькому НДІ особливо чистих біопрепаратів шляхом генної трансформації бактерій *Escherichia coli*. Дослідження проводили на білих нелінійних щурах масою 180-200 г. Клінічну картину фокального інсульту (ФІ) відтворювали на моделі двобічного фотоіндукованого тромбозу судин, при якому утворюється постійне за обсягом та локалізацією вогнище ішемії. Методика базується на принципі фотохімічної стимуляції утворення тромбів у судинах мозку при взаємодії світлового променя з флуоресцентним барвником, попередньо введеним у крово-



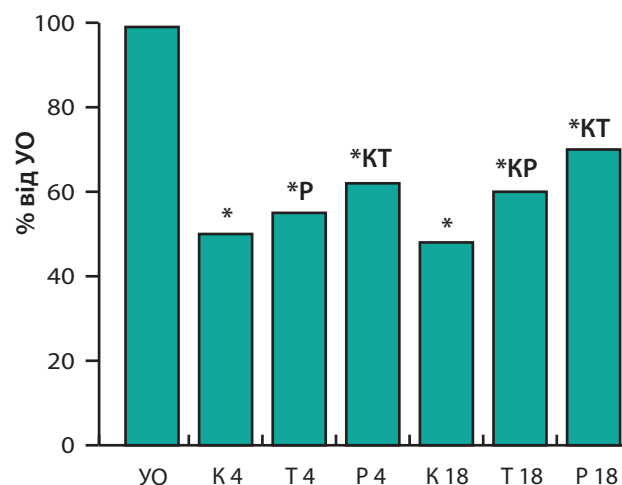
носне русло. Тварини були розділені на 3 групи по 10 щурів. Перша група – умовно оперовані тварини (УО), друга – тварини із ФІ (контрольна група), третя – тварини з патологією, яким вводили IL-1RA у дозі 7,5 мг/кг внутрішньом'язово відразу після виходу з наркозу і надалі 1 раз на добу протягом 18 днів. Після закінчення гострого періоду ішемії (4 дні) і фази відновлення (18 днів) тварин виводили з експерименту під етаміналнатрієвим наркозом шляхом декапітації. Для вивчення функціонального стану мітохондрій у гомогенаті мозку після ініціації циклоспорином-А визначали відкриття мітохондріальної пори (МП) спектрофотометрично [71]. Для вивчення активності тіол-дисульфідної системи визначали рівні відновлених та окиснених тіолів та глутатіону, активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази в гомогенаті головного мозку щурів із ФІ в ранньому та віддаленому постішемичних періодах. Сумарний вміст SH-груп визначали спектрофотометрично за реакцією з 5,5-дитіобіс-7-нітробензойною кислотою [72]. Концентрацію глутатіону окисненого і відновленого визначали флюорометрично в реакції з о-фталевим ангідридом [73]. Активність ферментів тіол-дисульфідної системи – глутатіонпероксидази (ГППР) та глутатіонредуктази (ГР) – визначали спектрофотометрично [74]. Отримані дані були проаналізовані варіаційно-статистичним методом із використанням критерію Стьюдента (t). Вірогідними вважали відмінності з рівнем значення більш ніж 95% ( $p < 0,05$ ), які позначали як рУО (щодо групи умовно оперованих тварин), рК (щодо контрольної групи), рТ (щодо групи тіотриазоліну) та рР (щодо групи IL-1RA).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У нашому експерименті в контрольній групі (рис. 1) відзначено негативні зміни функціонального стану мітохондріальної мембрани та порушення  $Ca^{2+}$ -гомеостазу – на 4-ту добу спостереження відкриття МП на тлі циклоспорино А було заблоковано на 48% порівняно з умовно оперованими тваринами ( $p_{УО} < 0,001$ ), в подальшому (на 18-ту добу) цей показник був нижчим за контрольні на 51% ( $p_{УО} < 0,001$ ).

Відомо, що мембранний потенціал у мембрані проявляється як електричне поле значної напруженості (~105 В/см), яке впливає на макромолекули мембрани і надає їхнім зарядженим групам певної просторової орієнтації, що забезпечує закритий стан активаційних воріт натрієвих каналів і відкритий стан їхніх інактиваційних воріт. При ішемичному ураженні тканини мозку внаслідок дефіциту кисню трансмембранний градієнт  $H^+$ -іонів змінюється, що призводить до зниження мембранного потенціалу. Виникає деполяризація та дестабілізація внутрішньої мембрани мітохондрій, формується так звана неселективна РТ-пора (permeability transition pore) [21, 38].

До складу РТ-пори входять білки внутрішньої мембрани, такі як ANT, та білки зовнішньої мем-



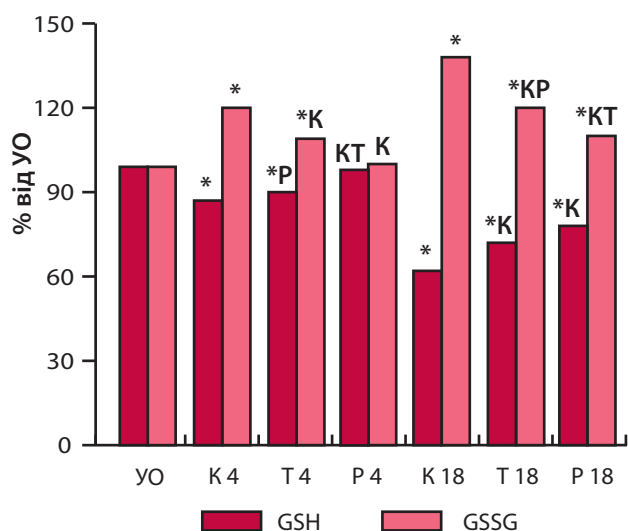
УО – група умовно оперованих тварин; К 4 та К 18 – контрольна група на 4-ту та 18-ту добу дослідю; Т 4 та Т 18 – група тіотриазоліну на 4-ту та 18-ту добу дослідю; Р 4 та Р 18 – група IL-1Ra на 4-ту та 18-ту добу дослідю.

Статистично вірогідні відмінності ( $p < 0,05$ ) щодо умовно оперованих тварин позначено знаком «\*», щодо тварин контрольної групи – «К», щодо тварин групи тіотриазоліну – «Т», щодо тварин групи IL-1Ra – «Р».

**Рисунок 1.** Показник відкриття мітохондріальної пори (МП) в мозку щурів із фокальним інсультом (на 4-ту та 18-ту добу)

брани, такі як залежний від напруги аніонний канал (voltage-dependent anion channel, VDAC), який працює в місцях контактів зовнішньої та внутрішньої мембран та через який можуть проходити молекули розміром порядку 1,5 кД. Відкриття такого каналу у внутрішній мембрані веде до встановлення рівноваги іонів у матриксі та міжмембранному просторі мітохондрій, поширює градієнт  $H^+$  по внутрішній мембрані та розриває респіраторний ланцюг. Відкриття РТ-пори призводить також до об'ємної дизрегуляції мітохондрій через гіперосмоляльність матриксу, результатом якої є збільшення об'єму матриксу, розриви зовнішньої мембрани та зростаюча дестабілізація мітохондрій і клітин мозку в цілому [22].

В експерименті IL-1Ra, введений шурам із ФІ, виявив значну мітопротекторну активність. Функціональну активність мітохондрій головного мозку щурів було стабілізовано вже в гострому періоді після ішемичного ушкодження тканини мозку – показник блокування відкриття МП збільшився на 26% у порівнянні з контрольною групою ( $p_K < 0,001$ ) та на 16% перевищив показники групи тіотриазоліну ( $p_T < 0,05$ ); у віддаленому періоді – на 43% перевищив рівень контрольної групи ( $p_K < 0,001$ ) та на 18% – показники групи тіотриазоліну ( $p_T < 0,05$ ). Отже, в групі IL-1Ra стабільність мітохондріальних пор ефективно відновлювалася, динамічно зростала з максимальним проявом у відновлювальному періоді. При цьому відновлювався фізіологічний іонний баланс, зникали прояви деполяризації, що запобігало дестабілізації внутрішньої мембрани мітохондрій, формуванню неспецифічного каналу – РТ-пори, розривів зовнішньої



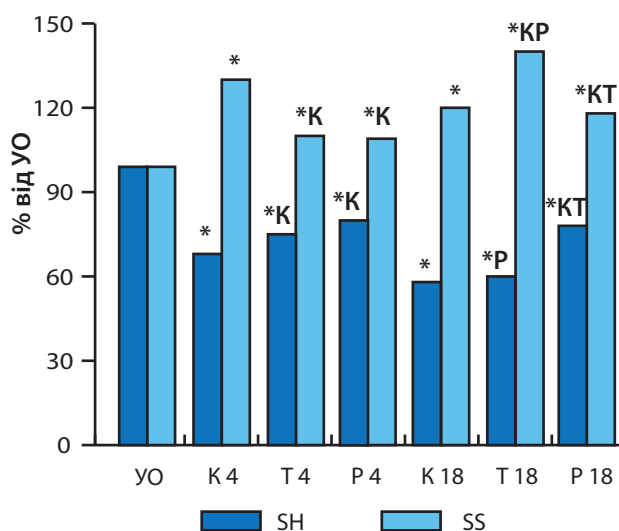
Див. позначення до рис. 1.

**Рисунок 2.** Вміст відновлених (GSH) та окиснених (GSSG) форм глутатіону в гомогенаті мозку щурів із фокальним інсультом (на 4-ту та 18-ту добу)

мембрани та мітоптозу (запрограмованій загибелі мітохондрій). Відкриття пор відбувається за рахунок окиснення або нітрозилування тіольних груп цистеїнзалежної ділянки білка внутрішньої мембрани мітохондрій (АТФ/АДФ-антипортера), тому особливу увагу було приділено стану тіол-дисульфідної системи. Більшість тіолів (глутатіон, цистеїн, метіонін) та пов'язані з ними ферментні системи прямо та опосередковано беруть участь у функціонуванні різних ланок захисту клітин. Внутрішньоклітинний пул глутатіону включає відновлену (GSH) та окиснену (GSSG) форми, змішані дисульфідні та тіоефіри. GSH, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза та НАДФН утворюють глутатіонову антипероксидну систему, яка ефективно захищає клітини головного мозку при розвитку оксидативного стресу.

В експерименті ми визначали рівні відновлених та окиснених тіолів та глутатіону, активність ГПР та ГР у гомогенаті головного мозку щурів із ФІ в ранньому та віддаленому постішемичних періодах. У контрольних тварин із ФІ в ранньому постішемичному періоді відзначено (в порівнянні з контрольними показниками) зниження рівня відновлених ( $p_{yO} < 0,05$ ) та підвищення на 23% рівня окиснених форм глутатіону ( $p_{yO} < 0,01$ ), що підтверджує формування порушення внутрішньоклітинного пулу глутатіону (рис. 2). Надалі цей дисбаланс посилюється, на 18-ту добу показники зниження відновлених та підвищення окиснених форм глутатіону досягли 34-38% ( $p_{yO} < 0,01$ ).

Аналогічні зміни зареєстровано в сумарному пулі тіолів (рис. 3) – у гомогенаті головного мозку на 4-ту добу зареєстровано зниження на 32% рівня відновлених тіолів та підвищення на 28% рівня окиснених тіолів у порівнянні з контрольними показниками ( $p_K < 0,001$ ).

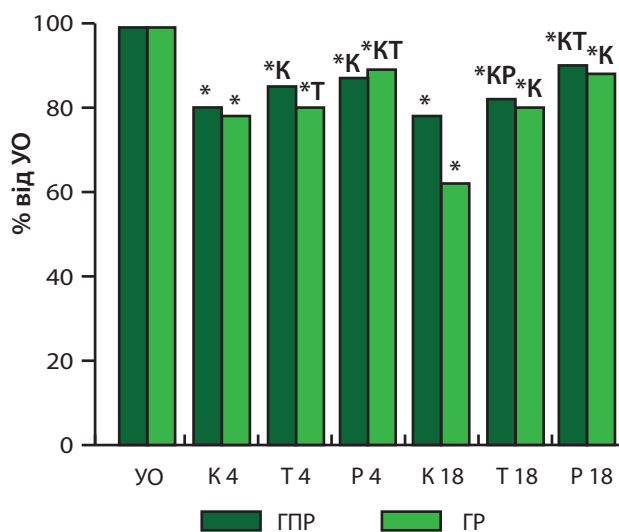


Див. позначення до рис. 1.

**Рисунок 3.** Вміст відновлених (SH) та окиснених (SS) тіолів у гомогенаті мозку щурів із фокальним інсультом (на 4-ту та 18-ту добу)

Глутатіонпероксидаза як один із важливих компонентів антипероксидної ферментної системи клітин ефективно її відновлює, запобігаючи накопиченню гідропероксидів і вторинних метаболітів та розвитку неферментних реакцій. Розвиток ФІ супроводжувався стабільним зниженням активності ГПР у гомогенаті мозку контрольних тварин (рис. 4) на 18-21% ( $p_{yO} < 0,01$ ) протягом усього терміну дослідження.

Подібні зміни відзначено щодо активності глутатіонредуктази, яка разом із ГПР має найбільше значення для підтримання в організмі певного рівня активного глутатіону шляхом відновлення його дисульфідної форми. Розвиток ФІ супроводжувався зниженням активності ГР (рис. 4) у гомогенаті



Див. позначення до рис. 1.

**Рисунок 4.** Вміст глутатіонпероксидази (ГПР) та глутатіонредуктази (ГР) у гомогенаті мозку щурів із фокальним інсультом (на 4-ту та 18-ту добу)

тканини мозку щурів контрольної групи в гострому періоді на 21% ( $p_{YO} < 0,05$ ) із подальшим прогресуванням до 36% на 18-ту добу ( $p_{YO} < 0,01$ ).

IL-1Ra, введений тваринам із ФІ, інгібує утворення окиснених форм глутатіону на 18-17% протягом усього терміну дослідження ( $p_K < 0,05$ ). Рівень відновлених форм глутатіону на 18-ту добу після ФІ відновлюється практично до рівня групи УО ( $p_K < 0,01$ ), що перевищує ефект тіотриазоліну ( $p_T < 0,05$ ). Також під дією IL-1Ra відзначено підвищення концентрації відновлених тіолів на тлі зниження їх окиснених форм ( $p_K < 0,01$ ). У групі IL-1Ra відновлюється стан ферментів тіол-дисульфідної системи – підвищується активність глутатіонпероксидази практично до рівня групи УО в гострому періоді після ФІ ( $p_K < 0,01$ ) та активність глутатіонредуктази на 32% у порівнянні з тваринами контрольної групи у віддаленому постішемичному періоді ( $p_K < 0,01$ ).

Результати проведеного дослідження підтверджують, що на моделі фокального інсульту у щурів постішемичне ушкодження тканини мозку супроводжувалося формуванням дисфункції мітохондрій та тіолдисульфідної системи – підвищенням вмісту окиснених форм тіолів і глутатіону на тлі зниження рівнів їх відновлених форм та активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Застосування IL-1Ra в дозі 7,5 мг/кг вірогідно стабілізує функціональну активність мітохондрій головного мозку щурів із ФІ, що підтверджується блокуванням відкриття мітохондріальних пор та нормалізацією стану ферментів тіолдисульфідної системи (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази). На моделі фокального інсульту у щурів мітопротекторна дія IL-1Ra щодо стабілізації функціонального стану мітохондрій та тіолдисульфідної системи більш виражена у відновлювальному періоді після ішемії, подібна до дії тіотриазоліну та перевищує її. Таким чином, IL-1Ra проявляє значний мітопротективний ефект при постгіпоксичних ушкодженнях, що дає змогу розглядати його як перспективний засіб у комплексній терапії постішемичних станів, зокрема для ефективного захисту тканини мозку при церебральних інсультах.

На завершення слід зауважити, що, незважаючи на активне застосування комбінованої патогенетичної терапії, цереброваскулярні захворювання загалом та ішемічний інсульт зокрема є потенційно небезпечними станами з досить тяжким клінічним перебігом, високим ризиком виникнення ускладнень, супутніх патологій та інвалідизації. На сьогодні механізми нейродеструкції вивчені всебічно й глибоко, але актуальною є необхідність удосконалення знань щодо значення цитокінової мережі в цілому та прозапальних цитокінів зокрема у формуванні ушкодження мозкової тканини. Це дасть змогу переривати нейродеструктивний каскад на більш ранніх ланках та забезпечить високу ефективність нейропротекції, зокрема шляхом застосування засобів цитокінової терапії для

корекції цитокінового статусу хворих з ішемічним інсультом.

#### Список літератури

- Olesen J. Consensus document on European brain research / J. Olesen, M.G. Baker, T. Freund et al. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* – 2006. – Vol. 77. – P. 1-49.
- Rosamond W. Heart Disease and Stroke Statistics – 2008 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee / W. Rosamond // *Circulation.* – 2008. – Vol. 117. – P. 25-146.
- Скворцова В.И. Медицинская и социальная значимость проблемы инсульта // В.И. Скворцова // *Качество жизни. Медицина.* – 2004. – № 4. – С. 10-12.
- Donnan G.A. A New Road Map for Neuroprotection. The 2007 Feinberg Lecture / G.A. Donnan // *Stroke.* – 2008. – Vol. 39. – P. 242-251.
- Green A.R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly / A.R. Green // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153. – P. 325-38.
- Neuroprotection and stroke: time for a compromise / A.R. Young, C. Ali, A. Duretete, D. Vivien // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 103. – P. 1302-1319.
- Muresanu D.F. Neurotrophic factors / D.F. Muresanu. – Bucuresti: Libripress, 2003. – P. 35-131.
- Bacigaluppi M. New targets of neuroprotection in ischemic stroke / M. Bacigaluppi, D.M. Hermann // *Scientific World J.* – 2008. – Vol. 13 (8). – P. 698-712.
- Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
- Дюба Д.Ш. Мультимодальный подход в лечении хронической ишемии мозга / Д.Ш. Дюба, С.К. Евтушенко // *Международ. невролог. журн.* – 2012. – № 8 (54). – С. 137-140.
- Беридзе М.З. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте / М.З. Беридзе, И.Т. Урушадзе, Р.Р. Шакаришвили // *Инсульт.* – 2001. – № 3. – С. 35-40.
- Eltzschig H.K. Hypoxia and inflammation / H.K. Eltzschig, P. Carmeliet // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364. – P. 656-665.
- Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.
- Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление.* – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 9-17.
- Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление.* – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-22.
- Лукьянова Л.Д. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью / Л.Д. Лукьянова, А.М. Дудченко // *Вестник РАМН.* – 2007. – № 2. – С. 3-13.
- Мурешану Д.Ф. Нейропротекция и нейропластичность – целостный подход и перспективы / Д.Ф. Мурешану // *Journal of the Neurological Sciences.* – 2007. – Vol. 257. – P. 38-43.
- Герасимова М.М. Иммунологические критерии в прогнозировании течения и исхода ишемического инсульта / М.М. Герасимова, Г.Н. Жданов // *Невролог. журн.* – 2005. – Т. 10, № 1. – С. 19-21.
- Путилина М.В. Комбинированная нейропротекторная терапия острых нарушений мозгового кровообращения / М.В. Путилина // *Consilium Medicum.* – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 28-39.
- Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов и др. // *Совр. пробл. токсикол.* – 2005. – № 3. – С. 20-26.
- Сазонтова Т.Г. Фактор транскрипции NIF-1α, белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии / Т.Г. Сазонтова, А.Г. Жукова, Н.А. Анчишкина и др. // *Вестник РАМН.* – 2007. – № 2. – С. 17-25.
- Dhar-Mascareno M. Hypoxia – reoxygenation – induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells / M. Dhar-Mascareno, J.M. Sacramo // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38, № 10. – P. 1548-1554.
- Манухина Е.Б. Защищающие и повреждающие эффекты перидической гипоксии: роль оксида азота / Е.Б. Манухина, Х.Ф. Дауни, Р.Т. Маллет и др. // *Вестник РАМН.* – 2007. – № 2. – С. 27-33.
- Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase / H. Kleinert, P. Schwarz, U. Forstermann // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 384, № 10-11. – P. 1343-1364.
- Виничук С.М. Нейропротекторная терапия в острый период ишемического инсульта / С.М. Виничук, В.О. Мохнач, М.М. Прокопів та ін. // *Міжнар. невролог. журн.* – 2008. – № 4 (20). – С. 42-48.
- Chamorro A. Role of inflammation in stroke and atherothrombosis // *Cerebrovasc. Dis.* – 2004. – Vol. 17 (Suppl. 3). – P. 1-5.

27. Виленский Б.С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение / Борис Сергеевич Виленский. – СПб.: Фолиант, 2002. – 397 с.
28. Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage / C. Iadecola // *In: Cerebral ischemia*. – New Jersey: Humana Press, 1999. – P. 3-33.
29. Pachter J.S. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system / J.S. Pachter, H.E. de Vries, Z. Fabry // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2003. – Vol. 62. – P. 593-604.
30. Скворцова В.И. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии / В.И. Скворцова // *Инсульт*. – 2003. – № 9. – С. 20-22.
31. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптической смерти клеток / Е.Б. Владимирская // *Гематология и трансфузиология*. – 2002. – Т. 42, № 2. – С. 35-40.
32. Лю Б.Н. Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / Б.Н. Лю // *Усп. совр. биологии*. – 2001. – Т. 121, № 5. – С. 488-501.
33. Фильченков А.А. Апоптоз кортикальных нейронов при развитии ишемических инсультов / А.А. Фильченков, В.Н. Залесский // *Нейрофизиология*. – 2002. – № 6. – С. 468-484.
34. Kehrer J.P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis / J.P. Kehrer // *Teratology*. – 2000. – Vol. 62. – P. 235-246.
35. Endres M. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family / M. Endres, S. Natura, M. Shimizu-Sasamata et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1998. – Vol. 18. – P. 238-247.
36. Бурчинский С.Г. Ишемия головного мозга: возможности комплексной фармакологической коррекции / С.Г. Бурчинский // *Укр. вісник психоневрології*. – 2006. – Т. 14, вип. 1 (46). – С. 15-18.
37. Lees K.R. Management of acute stroke / K.R. Lees // *Lancet Neurology*. – 2002. – Vol. 1. – P. 41-50.
38. Рациональная нейропротекция / И.Ф. Беленичев, В.И. Черный, Ю.М. Колесник и др. – Донецк: Изд. дом «Заславский», 2009. – 261 с.
39. Нейроиммунопатология: Руководство / Г.Н. Крыжановский, С.В. Магаева, С.В. Макаров и др. – М.: Изд-во НИИ общей патологии и патофизиологии, 2003. – 438 с.
40. Громова А.Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека / А.Ю. Громова, А.С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление*. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 3-12.
41. Dower S.K. IL-1 receptors / S.K. Dower, D.L. Urdal // *Immunol. Today*. – 1987. – Vol. 8. – P. 46-51.
42. Ferrarese C. Increase cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke / C. Ferrarese, P. Mscarucci, C. Zoai et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 1999. – Vol. 19, № 9. – P. 1004-1009.
43. Жданов Г.Н. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных в остром периоде ишемического инсульта / Г.Н. Жданов, М.М. Герасимова // *Цитокины и воспаление*. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 27-30.
44. Arend W.P. Interleukin-1 receptor antagonist // *Adv. Immunol.* – 1993. – Vol. 54, № 1. – P. 167-204.
45. Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease / W.P. Arend // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2002. – Vol. 13, № 4-5. – P. 323-340.
46. Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2005 / D.E. Furst, F.C. Breedveld, J.R. Kalden Zoai et al. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64, № 4. – P. 1112-1125.
47. Mertens M. Anakinra for rheumatoid arthritis / M. Mertens, J.A. Singh // *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. – 2009; Art. No.: CD005121. DOI: 10.1002/14651858. CD005121.pub3
48. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist / S. Nakae, S. Saijo, R. Horai et al. // *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – Vol. 100. – P. 5986-5990.
49. Тимчук Л.Э. Влияние полиморфизма генов семейства интерлейкина-1 на степень эффективности местной терапии рекомбинантным интерлейкином-1 бета (Беталейкин) / Л.Э. Тимчук, А.Ю. Громова, А.С. Симбирцев // *Рос. отоларингология*. – 2005. – № 2 (15). – С. 84-87.
50. Imyanitov E. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition / E. Imyanitov, K. Hanson, B. Zhivotovsky // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – P. 1004-1107.
51. Kumar A., Thota V., Dee L. et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 949-958.
52. Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension / F. Montecucco, A. Pende, A. Quercioli et al. // *J. Nephrol.* – 2011. – Vol. 24. – P. 23-34.
53. Фактор транскрипции HIF-1 $\alpha$ , белки срочного ответа и резистентность мембранных структур в динамике после острой гипоксии / Т.Г. Сазонтова, А.Г. Жукова, Н.А. Анчишкина и др. // *Вестник РАМН*. – 2007. – № 2. – С. 17-25.
54. Lipsky P.E. 102 week clinical and radiological results from the ATTRACT trial: a 2 year, randomized, controlled, phase 3 trial of infliximab (Remicade) in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate / P.E. Lipsky // *Arthritis Rheum.* – 2000. – Suppl. 47. – S. 242.
55. A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness / Y.F. Chen, P. Jobanputra, P. Barton et al. // *Health Technol Assess.* – 2006. – Vol. 10 (42). – P. 1-229.
56. Smolen J.S. When patients with rheumatoid arthritis fail tumour necrosis factor inhibitors: what is the next step? / J.S. Smolen, M.E. Weinblatt // *Ann Rheum Dis.* – 2008. – Vol. 67. – P. 1497-1498.
57. Neuroplasticity and Rehabilitation / Editor S.A. Raskin // *The Guilford Press*. – 2011. – 351 p.
58. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology / T. Kishimoto // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 1-21.
59. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease / N. Nishimoto, Y. Kanakura, K. Aozasa et al. // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – P. 2627-2632.
60. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial / J.S. Smolen, A. Beaulieu, A. Rubbert-Roth et al. // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371. – P. 987-997.
61. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial / S. Yokota, T. Imagawa, M. Mori et al. // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371. – P. 998-1006.
62. Genetic and metabolic status of NGF-deprived sympathetic neurons saved by an inhibitor of ICE family proteases / M. Deshmukh, J. Vasilakos, T. L. Deckwerth et al. // *J. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 135, № 5. – P. 1341-1354.
63. The neuroprotection of prodromal transient ischaemic attack on cerebral infarction / Y. Fu, J.L. Sun, J.F. Ma et al. // *Eur. J. Neurol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 135-144.
64. Chaudhari B.R. Following the TRAIL to apoptosis / B.R. Chaudhari, R.F. Murphy, D.K. Agrawal // *Immunol. Res.* – 2006. – Vol. 35. – P. 249-262.
65. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis / G.S. Robertson, S.J. Crocker, D.W. Nicolson, J.B. Schulz // *Brain Pathol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 283-292.
66. Gruber H.E. Antiapoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cell in vitro / H.E. Gruber, H.J. Norton, E.N. Hanley // *Spine*. – 2000. – Vol. 25. – P. 2153-2157.
67. Braddock M. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention / M. Braddock, A. Quinn // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2004. – Vol. 3. – P. 330-339.
68. Дзяк Л.А. Инсульт у пациентов молодого возраста / Л.А. Дзяк, Е.С. Цуркаленко // *Практическая ангионеврология*. – 2010. – № 2. – С. 9-14.
69. Blum A. Role of cytokines in heart failure / A. Blum, H. Miller // *Am. Heart. J.* – 1998. – Vol. 135. – P. 181-186.
70. Dietrich W.D. Cerebral endothelial microvilli: Formation following global cerebral ischemia / W.D. Dietrich, R. Busto, M.D. Ginsburg // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1984. – Vol. 43. – P. 72-83.
71. Акопова Л.В. Снижение чувствительности митохондрий к Ca<sup>2+</sup>-зависимому открытию поры в условиях длительной инкубации / Л.В. Акопова, В.Ф. Сагач // *Укр. биохим. журн.* – 2004. – Т. 76, № 35. – С. 61-65.
72. Прохорова М.И. Современные методы в биохимии (углеводный и энергетический обмен) / – Л.: Изд-во ЛГУ, 1986. – 368 с.
73. Кулинский В.И. Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко, В.В. Шпрых и др. // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2005. – Т. 1 (39). – С. 63-65.
74. Асагиани В.С. Ферментные методы анализа / В.С. Асагиани. – М.: Наука, 1969. – 739 с.