

ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МОЗГА И В ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ПАНАВИРА

И. В. Острова, М. Ш. Аврущенко, Ю. В. Заржецкий, А. В. Афанасьев, А. В. Волков

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

Gender Differences in Postresuscitative Brain Injury and in the Efficacy of the Immunomodulator Panavir

I. V. Ostrova, M. Sh. Avrushchenko, Yu. V. Zarzhetsky, A. V. Afanasyev, A. V. Volkov

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Цель исследования — выяснить, проявляются ли половые различия в морфофункциональном состоянии мозга реанимированных животных, а также в действии иммуномодулятора панавира. **Материал и методы.** У половозрелых белых крыс обоего пола вызывали 10-минутную остановку сердца с последующей реанимацией. Панавир вводили в/м в дозе 0,02 мг/кг на 30-й минуте после оживления и через сутки. Проводилась балльная оценка неврологического статуса реанимированных животных. На 14-е сутки постреанимационного периода определяли плотность и состав популяций пирамидных нейронов полей СА1 и СА4 гиппокампа и клеток Пуркинье латеральной области мозжечка. Реакцию иммунной системы оценивали методом иммуноферментного анализа по наличию в плазме крови фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) через сутки после оживления. **Результаты.** У реанимированных животных выявлены половые различия по срокам восстановления неврологического статуса и летальности. Установлено, что лечение панавиром приводит к ускорению темпов неврологического восстановления у реанимированных животных обоего пола. Выявлены гендерные различия в постреанимационных изменениях исследованных нейрональных популяций. Панавир способствовал предупреждению гибели нейронов, однако его эффективность была неодинакова у животных разного пола. **Заключение.** Результаты настоящего исследования указывают на необходимость учитывать гендерные особенности организма при разработке подходов к патогенетически обоснованной профилактике и терапии постгипоксических энцефалопатий. **Ключевые слова:** ишемия-реперфузия, нейрональные популяции, иммуномодуляторы, половые различия.

Objective: to clarify whether gender differences are shown morphofunctional state of the brain of resuscitated animals and in the effects of the immunomodulator panavir. **Materials and methods.** Adult white rats of both sexes underwent 10-minute cardiac arrest, followed by resuscitation. Panavir was intramuscularly injected in a dose of 0.02 mg/kg at 30 minutes and 24 hours postresuscitation. The neurological status of the resuscitated animals was rated in scores. The density and composition of pyramidal neurons in the CA1 and CA4 hippocampal sectors and those of Purkinje cells in the lateral cerebellum were determined on day 14 after resuscitation. An immune response was assessed by enzyme immunoassay from the plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 24 hours following resuscitation. **Results.** The resuscitated animals were found to have gender differences in the time of neurological recovery and mortality rates. Panavir treatment was ascertained to result in an increase in the rates of neurological recovery in the resuscitated animals of both sexes. There were gender differences in the postresuscitation changes of the study neuronal populations. Panavir promoted the prevention of neuronal death; however, its efficacy was dissimilar in animals of different sexes. **Conclusion.** The results of the present study show it necessary to take into account the gender features of the body while developing approaches to pathogenetically sounded prevention and therapy for posthypoxic encephalopathies. **Key words:** ischemia-reperfusion, neuronal populations, immunomodulators, gender differences.

Ишемия-реперфузия запускает каскад патологических событий, которые приводят к гибели нервных клеток [1]. Иммунная система играет важную роль в постишемической патологии головного мозга [2]. С этим связан возникший в последнее время интерес к проблеме терапевтической модификации постишемического иммунного процесса. Так, был выявлен иммуномодулирующий эффект стероидных гормонов при

инсульте и кровопотере [3, 4]. Показано, что прогестерон ингибирует воспалительный ответ после экспериментального инсульта, смягчая тяжесть повреждения мозга [5]. Другой препарат — селениум — снижал уровень провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β в префронтальной коре и гиппокампе крыс, перенесших ишемию, при этом значительно уменьшалась гибель нейронов в этих структурах [6]. С уменьшением продукции цитокинов связывают также нейропротекторный эффект гипотермии [7].

Новый отечественный препарат панавир обладает иммуномодулирующими свойствами, оказывая стимулирующее влияние на иммунные механизмы защи-

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Острова Ирина Васильевна
E-mail: irinaostrova@mail.ru

ты организма. В ряде клинических и экспериментальных исследований отмечены гендерные отличия в реакции иммунной системы при критических состояниях [8, 9]. Ранее нами были выявлены гендерные различия в нейропротективном эффекте экзогенных половых гормонов [10].

Цель работы — выяснить, проявляются ли половые различия в морфофункциональном состоянии мозга реанимированных животных, а также в действии иммуномодулятора панавира.

Материал и методы

В эксперименте использовали 97 белых беспородных крыс обоего пола весом 190–250 г. Остановку сердца на 10 минут вызывали у животных путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка сердца [11]. Оживление проводили непрямым массажем сердца в сочетании с искусственной вентиляцией легких воздухом с внутритрахеальным введением раствора адреналина в дозе 0,1 мг/кг. Панавир вводили в/м в дозе 0,02 мг/кг на 30-й минуте после оживления и через сутки. Неврологический статус животных оценивали по 100-балльной шкале, включающей 19 показателей [12]. Контролем служили интактные крысы соответствующего пола и возраста. Для морфологического исследования, животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом через 14 суток после реанимации. Образцы мозга после стандартной обработки заливали в парафин. С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм, которые затем окрашивались крезиловым фиолетовым по Нисслю. Процессы дистрофического изменения и гибели клеток Пуркинье (КП) мозжечка и пирамидных нейронов гиппокампа (поля CA1 и CA4) оценивали, используя метод дифференцированного морфометрического анализа [13]. Рассчитывали общую плотность популяции и число нейронов разных типов (светлые, темные и морфологически измененные нейроны). В группу «темных» включали нейроны с более темной окраской ядра и цитоплазмы, в группу «морфологически измененных» — нейроны с разными видами патологии (см. рисунок). Подсчет клеток производили с помощью системы анализа изображений (микроскоп Olympus BX-500, программы ImageScopeM, Excel). Реакцию иммунной системы оценивали методом иммуно-

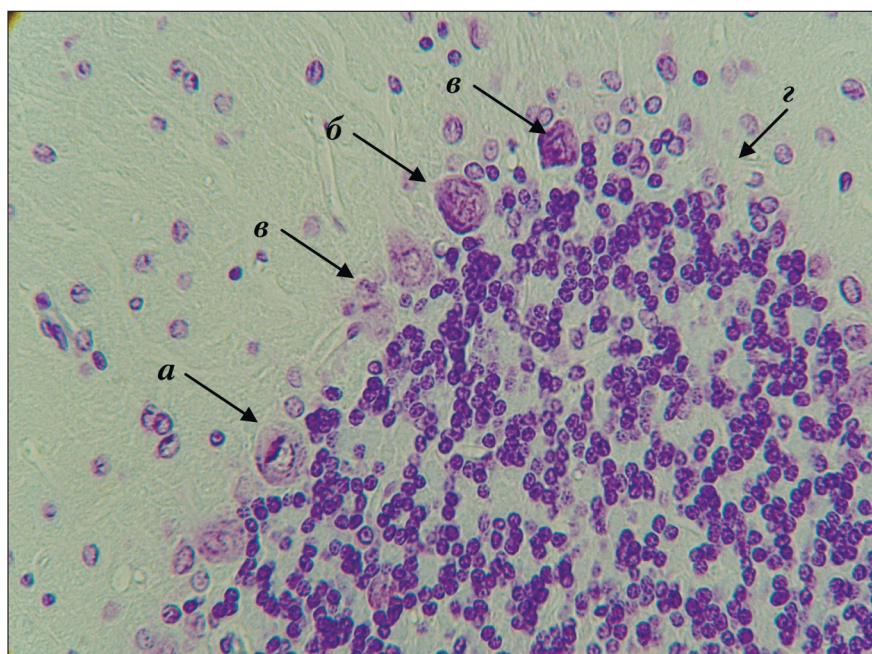
ферментного анализа по наличию в плазме крови фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) через сутки после оживления.

Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических (U-критерий Манна-Уитни, точный метод Фишера- ϕ в угловом преобразовании, критерий λ Колмогорова-Смирнова) методов.

Результаты и обсуждение

У реанимированных животных выявлены половые различия по срокам восстановления неврологического статуса и летальности ($p_{\lambda} \leq 0,05$) (табл. 1). Установлено, что лечение панавиром приводит к ускорению темпов неврологического восстановления у реанимированных животных обоего пола ($p_{\lambda} \leq 0,05$).

Учитывая, что в норме TNF- α выявляется не у всех крыс, сравнение групп проводили по доле животных с наличием в крови этого цитокина в каждой экспериментальной группе. Установлено, что применение панавира у реанимированных крыс обоего пола приводит к уменьшению доли животных с наличием TNF- α в плазме крови в сравнении с нелечеными (на 86 и 60%, у самцов и самок, соответственно, $p_{\phi} \leq 0,05$).



Слой клеток Пуркинье мозжечка (а — светлые; б — темные; в — морфологически измененные; г — выпадение нейронов). Окраска по Нисслю. Ув. $\times 400$.

Таблица 1

Характеристика реанимированных животных по срокам неврологического восстановления и летальности

Группа/пол	Восстановление неврологического статуса после клинической смерти в % (сутки)				Погибли
	3-и	4-е	5-е	6-е	
Самцы без лечения (n=20)	0	0	50	50	0
Самки без лечения (n=27)	4	22	44	8	22
Самцы с лечением панавиром (n=14)	7,1	35,7	35,8	21,4	0
Самки с лечением панавиром (n=17)	17,6	41,2	35,3	0	5,9

Таблица 2

Общая плотность и число нейронов разного типа (на 1 мм длины) в популяции пирамидных нейронов поля СА1 у интактных и реанимированных (нелеченых и леченых) самцов и самок ($M \pm m$)

Тип нейронов	Интактные		Реанимированные		Реанимированные+панавир	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Светлые	150,2±11,6	154,5±7,3	120,1±14,8 [#]	116,7±14,5 *	138,2±16,9	114,3±6,6 *
Темные	103,6±9,4	104,7±9,6	106,6±8,9	87,9±15,4	120,8±4,9	100,8±8,8
Морфологически измененные	29,6±2,9	24,2±3,2	27,8±2,9	33,5±8,2	26,9±4,7	36,8±2,8
Общая плотность популяции	283,4±7,5	283,5±5,3	254,5±15,9 [#]	238,1±26,8 *	285,9±17,4	252,0±9,5 [#]

Примечание. * — $p \leq 0,05$; # — $p \leq 0,1$ по сравнению с интактными животными соответствующего пола.

Таблица 3

Общая плотность и число нейронов разного типа (на 1 мм длины) в популяции пирамидных нейронов поля СА4 у интактных и реанимированных (нелеченых и леченых) самцов и самок ($M \pm m$)

Тип нейронов	Интактные		Реанимированные		Реанимированные+панавир	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Светлые	92,1±5,8	89,9±6,9	68,9±15,9 [#]	87,8±13,0	89,4±4,7	83,2±7,6
Темные	67,1±3,1	55,4±4,8	59,9±5,9	60,7±7,6	65,6±4,1	58,4±5,9
Морфологически измененные	42,3±3,1	46,9±5,7	36,6±6,1	39,3±4,7	43,8±4,7	38,5±8,9
Общая плотность популяции	201,6±5,4	192,6±4,9	165,6±15,8*	187,8±5,4	198,8±10,3	180,3±4,3

Примечание. * — $p < 0,05$; # — $p < 0,1$ по сравнению с интактными животными соответствующего пола.

Таблица 4

Общая плотность и число нейронов разного типа (на 1 мм длины) в популяции клеток Пуркинье мозжечка у интактных и реанимированных (нелеченых и леченых) самцов и самок ($M \pm m$)

Тип нейронов	Интактные		Реанимированные		Реанимированные+панавир	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Светлые	8,9±0,7	7,2±0,7	5,8±0,8**	4,8±0,6*	6,2±0,7*	6,0±0,2
Темные	3,7±0,3	3,5±0,3	4,6±0,4	2,5±0,4 [#]	3,8±0,7	4,3±0,4
Морфологически измененные	4,8±0,2	6,9±0,4	3,6±0,8	5,7±0,9	4,6±0,5	6,4±0,4
Общая плотность популяции	17,5±0,6	17,7±0,8	13,9±0,6***	12,9±0,5***	14,6±0,3***	16,7±0,3

Примечание. *** — $p < 0,005$; ** — $p < 0,025$; * — $p < 0,05$; # — $p < 0,1$ по сравнению с интактными животными соответствующего пола.

У реанимированных самцов в поле СА1 гиппокампа обнаружены процессы гибели нервных клеток, о чем свидетельствовало снижение общей плотности популяции в сравнении с интактными животными на 10,2% (за счет уменьшения числа светлых — наиболее реактивных — нейронов на 20,0%) (табл. 2). Леченные панавиром реанимированные самцы не отличались от интактных по исследованным показателям (табл. 2). У реанимированных самок, так же как и у самцов, была выявлена гибель нервных клеток: снижение общей плотности популяции нейронов в сравнении с контролем на 16,0% (за счет уменьшения числа светлых клеток на 24,5%) (табл. 2). У леченных панавиром реанимированных самок общая плотность популяции также снижалась на 10,3% (за счет уменьшения числа светлых нейронов на 22,8%) (табл. 2).

Итак, в поле СА1 гиппокампа применение панавира способствовало предупреждению развития процессов гибели нейронов только у самцов.

В поле СА4 гиппокампа у реанимированных самцов развивались процессы выпадения нейронов, о чем свидетельствовало снижение общей плотности популяции на 17,9% (за счет уменьшения числа светлых нейронов на 25,1%) (табл. 3). У леченных панавиром реани-

мированных самцов не обнаружено отличий от интактных животных ни по составу, ни по общей плотности популяции нейронов (табл. 3). Следовательно, панавир предотвратил гибель нейронов в поле СА4 гиппокампа у самцов крыс. У реанимированных самок, в отличие от самцов, общая плотность и состав популяции нейронов поля СА4 соответствовали контролю, т.е. процессы дистрофического изменения и/или гибели нейронов не развивались. Леченные панавиром реанимированные самки также не отличались от интактных крыс (табл. 3).

В мозжечке реанимированных самцов к 14-м суткам постреанимационного периода развивались процессы гибели нейронов, о чем свидетельствует снижение общей плотности популяции КП в сравнении с контролем на 20,6% (табл. 4). При этом происходило уменьшение числа светлых клеток (на 34,8%). У леченных панавиром реанимированных самцов в сравнении с интактными также снижалась общая плотность популяции на 16,6 % (за счет уменьшения числа светлых клеток на 30,3%). Следовательно, у самцов применение панавира не предупредило развития процессов гибели КП. У реанимированных самок, также как и у самцов, обнаружено выпадение нейронов: снижение общей плотности популяции на 27,1%. При этом гибели под-

вергались не только ранимые светлые клетки (уменьшение их числа на 33,3%), но и более стабильные — темные клетки (их число уменьшалось на 28,6%). У леченых панавиром реанимированных самок не выявлено достоверных отличий от интактных животных. Следовательно, у самок в отличие от самцов применение панавира способствовало предотвращению гибели нейронов в популяции КП мозжечка.

Заключение

Способность панавира предупреждать гибель нейронов в постреанимационном периоде, очевидно, связана с его действием на иммунную систему, проявляющимся в снижении уровня TNF- α . Существенная роль TNF- α в повреждении нервных клеток выявлена и на других экспериментальных моделях ишемии [5, 7, 14, 15].

Литература

1. Neumar R. W. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann. Emerg. Med.* 2000; 36 (5): 483–506.
2. Chamorro A., Urra X., Planas A. M. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 2007; 38 (3): 1097–1103.
3. Gibson C. L., Constantin D., Prior M. J. *et al.* Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* 2005; 193 (2): 522–530.
4. Knöferl M. W., Angele M. K., Schwacha M. G. *et al.* Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. *Crit. Care Med.* 2002; 30 (4): 888–893.
5. Wang J., Jiang C., Li X. *et al.* The protective mechanism of progesterone on blood-brain barrier in cerebral ischemia in rats. *Brain Res. Bull.* 2009; 79 (6): 426–430.
6. Ozbal S., Erbil G., Koçdor H. *et al.* The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neurosci. Lett.* 2008; 438 (3): 265–269.
7. Xiong M., Yang Y., Chen G.Q., Zhou W. H. Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. *Brain Res. Bull.* 2009; 79 (6): 351–357.
8. Choudhry M. A., Bland K. I., Chaudry I. H. Gender and susceptibility to sepsis following trauma. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 2006; 6 (2): 127–135.
9. Angele M. K., Schwacha M. G., Ayala A., Chaudry I. H. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock* 2000; 14 (2): 81–90.
10. Острова И. В., Аврущенко М. Ш., Волков А. В., Заржецкий Ю. В. Половые различия структурных изменений головного мозга в постреанимационном периоде. *Общая реаниматология* 2009; V(6): 60–65.
11. Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З. Моделирование клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс. *Патол. физиол. и эксперим. терапия* 1982; 3: 78–80.
12. Лысенков С. П., Корпачев В. Г., Тель Л. З. Балльная оценка общего состояния крыс, перенесших клиническую смерть. *Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний*. Новосибирск; 1982. 8–13.
13. Аврущенко М. Ш. Изменение гетерогенных нейронных популяций в постреанимационном периоде после остановки сердца у крыс. *Анестезиология и реаниматология* 1994; 5: 41–44.
14. Berger S., Savitz S.I., Nijhawan S. *et al.* Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49 (8): 3605–3610.
15. Kaloustian S., Bah T. M., Rondeau I. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction. *Apoptosis* 2009; 14 (11): 1308–1316.

Поступила 9.11.10