

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ У КИНДЛИНГОВЫХ КРЫС И ЭФФЕКТЫ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА

**Е.В. Коболев, В.В. Десятский,
Л.С. Годлевский**

Кафедра биофизики, информатики и медицинской аппаратуры
Одесский госмедуниверситет
Валеховский пер., 2, Одесса, Украина, 65082

В.Ф. Мустяца, Г.А. Дроздова

Кафедра патологической физиологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Макляя, 8, Москва, Россия, 117198

В условиях острых опытов на крысах-самцах линии Вистар показано, что при формировании киндлинга с помощью повторного применения первоначально подпороговой дозы коразола (30,0 мг/кг, внутривенно) происходит снижение выраженности бластной трансформации лимфоцитов, вызываемой с помощью бактериального липополисахарида и фитогемагглютинина. Данный эффект обнаруживается после 10 инъекций конвульсанта и его выраженность увеличивается при сформированном киндлинге (21 инъекция). Применение пентоксифиллина (25,0—50,0 мг/кг, в/бр) предотвращает развитие эпилептогенных эффектов коразола, уменьшает выраженность эффекта подавления бласттрансформации лимфоцитов.

Ключевые слова: коразол, фармакологический киндлинг, бластная трансформация, лимфоциты, пентоксифиллин.

Возникновение и развитие судорожного приступа связано с метаболическими нарушениями, изменяющими активность иммунокомпетентной системы [1, 2, 6]. В патогенезе судорожной активности определено важное значение активирования опиатной системы [3], многие эффекты которой опосредованы интерлейкином-1- β [6] (ИЛ-1 β). ИЛ-1 β стимулирует секрецию кортикотропин-рилизинг фактора, обеспечивающего выделение глюкокортикостероидов, что ограничивает выраженность иммунологического ответа [7].

Возможно полагать, что изменение иммунологической реактивности имеет место и в условиях формирования хронической эпилептизации мозга, в том числе и при киндлинге, вызванном повторными введениями коразола в подпороговой дозе.

Целью работы было исследование бластной трансформации лимфоцитов, вызываемой бактериальным липополисахаридом и фитогемагглютинином у киндлинговых крыс. Другой задачей было изучение данных изменений в условиях применения пентоксифиллина (ПТФ) — препарата, снижающего высвобождение эндогенных провоспалительных цитокинов [5].

Материал и методы исследования. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 200—270 г, возрастом 2—4 месяца. Все животные содержались в помещении с постоянной температурой 20 °С и 12-часовым циклом смены света и темноты, со свободным доступом к воде и пище.

Киндлинг у животных вызывали путем однократных ежедневных введений коразола в первоначально подпороговой дозе («Sigma», США, 30,0 мг/кг, в/бр). При этом после 3—5 инъекций эпилептогена у животных появлялись первые судорожные реакции: вздрагивания, судорожные сокращения отдельных мышц морды и ушей; через 5—7 введений конвульсанта развивались клонические судороги, охватывавшие передние конечности, а после 15—19 инъекций у крыс возникали генерализованные клонико-тонические приступы с падением животных на бок, постприступной депрессией и вегетативными нарушениями. Всего осуществляли 21 инъекцию конвульсанта, для наблюдений использовались животные с генерализованными клонико-тоническими судорогами. Тяжесть судорог оценивали по принятой шкале [3]. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем физиологического раствора NaCl.

Исследование бластной трансформации лимфоцитов осуществляли по методу [4]. Согласно данному методу, у крыс после декапитации удаляли селезенку, готовили суспензию клеток селезенки с помощью гомогенизатора («Tekmar», США), которую после трехкратного центрифугирования в растворе Хэнкса ресуспендировали в растворе RPMI-1640, который содержал 10% сыворотки крови плода теленка, 2-меркаптоэтанол ($5 \cdot 10^{-5}$ М). С помощью подсчета при окрашивании трипановым синим концентрацию клеток доводили до $4 \cdot 10^6$ клеток/мл. Суспензия клеток селезенки в объеме 0,1 мл размещалась в 96-луночном планшете. Затем в отдельные лунки добавляли по 0,1 мл раствор, содержащий фитогемагглютинин («Wellcome», Англия) (5 мкг/мл) или стандартный липополисахарид *E. coli* 055 («Serva») (10 мкг/мл). Планшеты выдерживали в течение 48 ч при температуре 37 °С в атмосфере, содержавшей 95% воздуха и 5% CO₂. После этого к лункам добавляли 0,5 мкКю [³H]тимидина и инкубировали дополнительно еще 18 ч в тех же условиях. После инкубации клетки собирали с помощью стеклянного фильтра и подсчитывали число распадов за 1 мин. с помощью стандартной жидкостной сцинтиляционной методики (счетчик ISOCAP-300 «Nuclear», США).

Определение митогенной активности лимфоцитов проводили у киндлинговых животных через 24 ч после 10-й и 21-й инъекций коразола, в контрольной группе — после соответствующих введений физиологического раствора, а также в отдельной группе крыс, у которых вызывали острые генерализованные судороги однократным введением коразола в дозе 50,0 мг/кг. ПТФ («Sigma», США) растворяли *ex tempore* в физиологическом растворе NaCl и вводили в/бр в дозах

25,0 и 50,0 мг/кг за 30 мин до инъекции коразола. Животным контрольной группы в аналогичных условиях вводили физиологический раствор NaCl.

Полученные результаты обрабатывали с применением статистических критериев ANOVA + Kruscall-Wallis.

Результаты исследования и их обсуждение. Средняя тяжесть судорожных реакций, которые отмечались после 10-го введения подпороговой дозы коразола в группе киндлинговых крыс, составила $2,3 \pm 0,3$ балла, а по окончании киндлинга (после 21-й инъекции) — $4,2 \pm 0,3$ балла. Выраженность судорожного синдрома в группах с применением ПТФ после 21-го введения конвульсанта соответственно $1,4 \pm 0,3$ и $1,7 \pm 0,3$ балла (дозы препарата 25,0 и 50,0 мг/кг соответственно), что было меньше, чем у крыс контрольной группы (киндлинговые животные с внутрибрюшинным применением физиологического раствора NaCl) ($p < 0,001$).

Изучение бластной трансформации лимфоцитов показало, что в условиях развития киндлинга у животных уже после 10-й инъекции коразола наблюдалось снижение включения [³H] тимидина как в условиях стимуляции бластогенной активности клеток селезенки с помощью бактериального липополисахарида (в 3,8 раз в сравнении с показателем в группе интактных животных $P < 0,001$), так и при стимуляции с помощью фитогемагглютинина (в 3,1 раза) ($P < 0,001$) (табл. 1). По завершении киндлинга (21-я инъекция коразола) происходило дальнейшее снижение исследуемого показателя, который в этот период был ниже такового, отмечавшегося у интактных крыс при стимуляции липополисахаридом и фитогемагглютинином соответственно в 18,6 и 24,6 раз ($P < 0,001$). При этом достоверное снижение исследовавшихся показателей наблюдалось и в сравнении с таковыми, регистрировавшимися после 10-й инъекции коразола, а также у крыс с острыми судорогами, вызванными инъекциями коразола (см. табл. 1).

Таблица 1

Изменения включения [³H]тимидина клетками селезенки крыс с острыми и киндлинговыми судорогами в ответ на применение бактериального липополисахарида и фитогемагглютинина (M ± m)

Показатель	Число распадов в суспензии клеток селезенки (в мин)	
	бактериальный липополисахарид	фитогемагглютинин
Интактные крысы (введение физиологического раствора NaCl) (n = 15)	20,5 ± 2,9	117,9 ± 12,2
Крысы с однократным введением судорожной дозы коразола (n = 10)	17,4 ± 2,6	103,5 ± 11,4
10 введений подпороговой дозы коразола (n = 10)	5,4 ± 1,1#	37,8 ± 7,4#
21 инъекция подпороговой дозы коразола (n = 10)	1,1 ± 0,3#*	4,8 ± 0,8#*

Примечание: # — $P < 0,001$ в сравнении с соответствующими показателями у животных с острыми коразол-вызванными судорогами; * — $P < 0,001$ — в сравнении с данными после 10-й инъекции подпороговой дозы коразола.

Под влиянием повторного введения ПТФ в дозе 25,0 мг/кг показатель бластной трансформации лимфоцитов превышал таковой у киндлинговых крыс без лечения в 5,8 раз в условиях применения бактериального липополисахарида

и в 6,3 раз — фитогемагглютинина ($P < 0,001$) (табл. 2). Применение препарата в большей дозе (50,0 мг/кг) сопровождалось развитием более выраженного эффекта — показатель бласттрансформации превышал таковой в группе с введением ПТФ в дозе 25,0 мг/кг в 1,7 и 2,5 раза ($P < 0,001$) (см. табл. 2).

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о значительном снижении функции лимфоцитов селезенки у животных в условиях развития киндлинга, выраженность которых увеличивается по мере возрастания интенсивности судорожных проявлений. Данный эффект проявлялся в уменьшении включения [^3H]-тимидина лимфоцитами в условиях применения факторов, стимулирующих митогенную активность — бактериального липополисахарида и фитогемагглютинина.

Таблица 2

Изменения показателя бластной трансформации лимфоцитов у киндлинговых животных под влиянием пентоксифиллина ($M \pm m$)

Показатель	Число распадов в суспензии клеток селезенки (в мин)	
	бактериальный липополисахарид	фитогемагглютинин
Контроль (внутрибрюшинное введение физиологического раствора NaCl) ($n = 10$)	$1,6 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,9$
ПТФ (25,0 мг/кг, внутрибрюшинно) ($n = 10$)	$9,2 \pm 1,2^*$	$35,9 \pm 7,4^*$
ПТФ (50,0 мг/кг, внутрибрюшинно) ($n = 10$)	$15,3 \pm 0,4^*\#$	$88,7 \pm 3,4^*\#$

Примечание: * $P < 0,001$ в сравнении с показателями у животных соответствующей контрольной группы, # $P < 0,001$ в сравнении с показателем в группе крыс, которым применяли ПТФ в дозе 25,0 мг/кг.

Следует отметить, что значительная продолжительность инкубации выделенных из организма киндлинговых животных иммунокомпетентных клеток свидетельствует в пользу того, что в наблюдаемом эффекте не принимает участия система супрессорных лимфоцитов, действие которых устраняется уже через 6—8 ч с момента начала инкубации [4].

Проявления киндлинга в значительной степени определяются повышенным высвобождением эндогенных опиатов [3], которые взаимодействуют с системой цитокинов. Показана роль ИЛ-1 β в процессинге проопиомеланокортина и секреции динорфина, установлено его взаимодействие с мью-опиатными рецепторами [1, 6]. Поскольку в настоящем исследовании установлена эффективность применения ПТФ в отношении иммунных нарушений у животных с киндлинг-синдромом, можно полагать, что в основе наблюдаемых нарушений находится повышенное образование ИЛ-1 β и, возможно, других провоспалительных цитокинов, имеющих патогенетическое значение в формировании эпилептогенных эффектов киндлинга [3]. Объяснением того, что вместо активации реакции бласттрансформации мы наблюдали ее угнетение, может быть указанный факт повышенной секреции глюкокортикостероидов под влиянием ИЛ-1 β .

Выводы. Таким образом, патогенетические механизмы коразол-индуцированного киндлинга, как модели, резистентной к терапии формы эпилептического синдрома, в существенной степени могут быть связаны с нарушениями со стороны иммунокомпетентной системы, цитокин-зависимыми нарушениями функции мононуклеарных клеток крови.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Взаимосвязь психоэмоционального состояния и иммунной системы // Успехи. физиол. наук. — 2004. — Т. 35. — № 4 — С. 49—64.
- [2] Евсеев В.А., Ветриле Л.А., Карнова М.Н. Нейроиммунопатологические аспекты эпилепсии // Вестник РАМН. — 2004. — Т. 8. — С. 43—46.
- [3] Godlevsky L.S., van Luijelaar E.L.J.M., Shandra A.A., Coenen A.M.L. Cause and effect relations in disease; lessons from epileptic syndromes in animals // Medical Hypotheses. — 2002. — V. 58. — P. 237—243.
- [4] Meiners I., Hauschildt S., Nieber K., Munch G. Pentoxifylline and propentophylline are inhibitors of TNF-alpha release in monocytes activated by advanced glycation endproducts // J. Neural. Transm. — 2004. — Vol. 111. — N 3. — P. 441—447.
- [5] Pross S., Klein T., Newton K., Friedman H. Enhanced suppression of blastogenic responses by weanling mouse lymphoid cells treated with tetrahydrocannabinol *in vitro* // Proc. Soc. Exp. Biol. and Medc. — 1997. — V. 187. — N 5. — P. 17—20.
- [6] Turrin N.P., Rivest S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy // Neurobiol. Dis. — 2004. — V. 16. — N 2. — P. 321—334.
- [7] Watanobe H., Sasaki S., Takebe K. Evidence that intravenous administration of interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing hormone secretion in the median eminence of freely moving rats: estimation by push-pul perfusion // Neurosci. Lett. — 1991. — V. 133. — N 1. — P. 7—10.

CHANGES OF BLASTOGENIC RESPONSE OF LYMPHOID CELLS IN KINDLED ANIMALS UNDER THE INFLUENCE OF PENTOXIPHYLLIN

E.V. Kobolev, V.V. Desyatsky,
L.S. Godlevsky

Department of Biophysics, Informatics and Medical Devices
Odessa State Medical University
Valehovskuy Lane, 2, Odessa, Ukraine, 65082

G.A. Drozdova, V.F. Mustyatsu

Department of Pathological Physiology
Medical faculty
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

Under condition of acute experiments on male Wistar rats it was shown that under condition of kindling formation induced via repeated subthreshold corazol administration (30,0 mg/kg, i.p.) the decreasing of blastogenic response induced by bacterial lypopolysaccharide and phytohemagglutinin was shown. This effect was detectable after 10-th convulsant injection and intensified in the course of kindling (21 injections of picrotoxin). Pentoxifyllin (25,0 and 50,0 mg/kg, i.p.) caused antiseizure effects and effectively prevented kindling-induced decreasing of blastogenic response in dose-dependent manner.

Key words: corazol, pharmacological kindling, blastogenic response, lymphoid cells, pentoxifyllin.