

Е.В.Кобелев

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ У КИНДЛИНГОВЫХ КРЫС И ЭФФЕКТЫ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА

Одесский государственный медицинский университет, Украина

Ключові слова: коразол, фармакологічний кіндлінг, лімфоцити, бластна трансформація, пентоксифілін.**Ключевые слова:** коразол, фармакологический киндлинг, лимфоциты, бластная трансформация, пентоксифиллин.**Key words:** corazol, pharmacological kindling, blastogenic response, lymphoid cells, pentoxiphyllin.

За умов гострих тестів на щурах-самцях лінії Вістар показано, що при формуванні кіндлінгу за допомогою повторного застосування спочату підпорогової дози коразола (30,0 мг/кг, в/чер) виникає зниження виразності бластної трансформації лімфоцитів, яке викликалось за допомогою бактеріального ліпополісахариду і фітогемаглютинину. Цей ефект відзначався після 10 ін'єкцій конвульсанта і його виразність збільшувалась при формуванні кіндлінгу (21 ін'єкція). Застосування пентоксифіліну (25,0- 50,0 мг/кг, в/чер) попереджало розвиток епілептогенних ефектів коразолу, зменшувало виразність ефекту пригнічення бласттрансформації лімфоцитів.

В умовах острих експериментів на крысах-самцях лінії Вістар показано, що при формуванні кіндлінгу з допомогою повторного застосування спочату підпорогової дози коразола (30,0 мг/кг, внутрішньочеревно) відбувається зниження вираженості бластної трансформації лімфоцитів, викликуваної з допомогою бактеріального ліпополісахариду і фітогемаглютинину. Даний ефект виявляється після 10 ін'єкцій конвульсанта і його вираженість збільшується при сформованому кіндлінгу (21 ін'єкція). Застосування пентоксифіліну (25,0- 50,0 мг/кг, в/бр) запобігає розвитку епілептогенних ефектів коразола, зменшує вираженість ефекту пригнічення бласттрансформації лімфоцитів.

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 lipopolysaccharide and phytohemagglutinin was shown. This effect was detectable after 10-th convulsant injection and intensified in the course of kindling (21 injections of picrotoxin). Pentoxiphyllin (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.

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 $-1-\beta$ [6] (ИЛ-1 β). ИЛ-1 β стимулирует инкрецию 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.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ - 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].

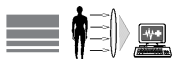
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар массой 200-270 г возрастом 2- 4 месяца. Все животные содержались в помещении с постоянной температурой 20°C и 12- часовым циклом смены света и темноты, со свободным доступом к воде и пище.

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, еще через 5-7 введений конвульсанта развивались клонические судороги, охватывавшие передние конечности и 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 (5×10^{-5} М). С помощью подсчета, при окрашивании трипановым синим, концентрацию клеток доводили до 4×10^6 клеток/мл. Суспензия клеток селезенки в объеме 0,1 мл размешалась в 96- луночном планшете. Затем добавляли в отдельные лунки по 0.1 мл растворов 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°C в атмосфере содержащей 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 И ОБСУЖДЕНИЕ. Средняя тяжесть судорожных реакций, которые отмечались после 10-го введения подпороговой дозы коразола в группе киндлинговых крыс, составила 2,3+ 0,3 балла, а по окончании киндлинга (после 21-й инъекции) - 4,2+ 0,3 балла. Выраженность судорожного синдрома в группах, с применением ПТФ после 21-го введения конвульсанта, соответственно 1,4+ 0,3 и 1,7+ 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 коразол-вызванными судорогами (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)

	Число распадов (в мин) в суспензии клеток селезенки	
	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 ($P<0,001$) (табл. 2).

Таблица 2

Изменения показателя бластной трансформации лимфоцитов у киндлинговых животных под влиянием пентоксифиллина (M+m)

	Число распадов (в мин) в суспензии клеток селезенки	
	Бактериальный липополисахарид	Фитогемагглютинин
Контроль (внутрибрюшинное введение физиологического раствора NaCl) (n=10)	1,6± 0,2	5,7± 0,9
ПТФ (25,0 мг/кг, внутрибрюшинно) (n=10)	9,2± 1,2*	35,9± 7,4*
ПТФ (50,0 мг/кг, внутрибрюшинно) (n=10)	15,3± 0,4*#	88,7± 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.

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.

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 [1, 6]. Показана роль ИЛ-1 β в процессинге проопиомеланокортина и секреции динорфина, установлено его взаимодействие с мю-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 на-



рушений находится повышенное образование ИЛ-1 β и, возможно, других провоспалительных цитокинов, имеющих патогенетическое значение в формировании эпилептогенных эффектов киндинга [3]. Объяснением того факта, что вместо активации реакции бласттрансформации мы наблюдали ее угнетение может быть указанный факт повышенной инкретии глюкокортикостероидов под влиянием ИЛ-1 β .

ВЫВОДЫ

Таким образом, патогенетические механизмы коразол-индуцированного киндинга, 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. Взаимосвязь психоэмоционального состояния и иммунной системы / Э.Б.Арушанян, Э.В.Бейер // Успехи физиол.наук.- 2004.- Т.35, №4.0 С.49-64
2. Евсеев В.А. Нейроиммунопатологические аспекты эпилеп-

сии/ В.А.Евсеев, Л.А.Ветриле, М.Н.Карпова // Вестник РАМН.- 2004.-Т.8.- С. 43- 46.

3. Cause and effect relations in disease; lessons from epileptic syndromes in animals/ L.S.Godlevsky, E.L.J.M.van Luijtelaaar, A.A.Shandra, A.M.L.Coenen //Medical Hypotheses.- 2002.- V.58.- P. 237- 243.

6. Pentoxifylline and propentophylline are inhibitors of TNF-alpha release in monocytes activated by advanced glycation endproducts/ I.Meiners, S.Hauschildt, K.Nieber, G. Munch // J. Neural. Transm .- 2004.- Vol.111, N3.- P.441-447.

7. Enhanced suppression of blastogenic responses by weanling mouse lymphoid cells treated with tetrahydrocannabinol *in vitro* / S.Pross, T.Klein, K.Newton, H.Friedman// Proc. Soc. Exp. Biol. and Medc.- 1997.- V.187, N5.- P. 17-20.

8. Turrin N.P., Rivest S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy/ N.P.Turrin, S.Rivest // Neurobiol. Dis.- 2004.- V.16, N2.- P.321-334.

9. 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/ H.Watanobe, S.Sasaki, K.Takebe // Neurosci. Lett.- 1991.-V.133, N1.- P. 7-10.

Сведения об авторе: Коболев Евгений Владимирович, канд. мед. наук, ассистент кафедры гигиены и медицинской экологии Одесского государственного медицинского университета.

Адрес для переписки: ОГМУ, 2 Валеховский пер., 2, Одесса-65082, тел.: +048-7178916

УДК 617.741.-004.1-089.843-002+616.379-008.64

Е.О. Костровская¹, Е.В. Кравченко¹, М.Б. Безуглый² ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ РАННЕГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА ПОСЛЕ ФАКОЭМУЛЬСИФИКАЦИИ КАТАРАКТЫ С ИМПЛАНТАЦИЕЙ ИОЛ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

¹Запорожская медицинская академия последипломного образования,

²Запорожский государственный медицинский университет

Ключові слова: факоемулсифікація катаракти, цукровий діабет, запальна реакція, післяопераційний період.

Ключевые слова: факоэмульсификация катаракты, сахарный диабет, воспалительная реакция, послеоперационный период.

Key words: cataract phacoemulsification, diabetes mellitus, inflammatory reaction, post-op period.

Мета дослідження: вивчення особливостей післяопераційної ексудативно-запальної реакції (ПЕЗР) після ФЕК у пацієнтів з цукровим діабетом II типу. Спостерігали 36 пацієнтів (40 очей) з цукровим діабетом і 24 пацієнти (26 очей) без діабету, зіставних за віком, статтю, ступенем зрілості катаракти і супутньої патології окрім діабету. Всім пацієнтам проводили ФЕК з імплантацією ІОЛ. ПЕЗР досліджували до операції і на 1-й, 4-й і 10-й післяопераційні дні за допомогою бальної оцінки, пахиметрії роگیвки в центральній зоні на Visante ОСТ і зорових функцій. Результати: ПЕЗР після ФЕК у діабетиків значно більше виражена, ніж у пацієнтів без діабету. Вона проявляється в посиленні клінічної картини запалення, значнішому збільшенні товщини роگیвки в післяопераційному періоді і відповідно нижчими зоровими функціями на ранніх стадіях після ФЕК.

Цель исследования: изучение особенностей послеоперационной экссудативно-воспалительной реакции после ФЭК у пациентов с сахарным диабетом II типа. Наблюдали 36 пациентов (40 глаз) с сахарным диабетом и 24 пациента (26 глаз) без диабета, сопоставимых по полу, возрасту, степени зрелости катаракты и сопутствующей патологии кроме диабета. Всем пациентам проводили ФЭК с имплантацией ИОЛ. ПЭВР исследовали до операции и на 1-й, 4-й и 10-й послеоперационные дни с помощью балльной оценки, пахиметрии роговицы в центральной зоне на Visante OCT и зрительных функций. Результаты: ПЭВР после ФЭК у диабетиков значительно более выражена, чем у пациентов без диабета. Она проявляется в усилении клинической картины воспаления, более значительном увеличении толщин роговицы в послеоперационном периоде и соответственно более низкими зрительными функциями на ранних стадиях после ФЭК.

Research objective: studying of inflammatory reaction after phacoemulsification at patients with diabetes of II type. Investigated 36 patients (40 eyes) with a diabetes and 24 patients (26 eyes) without diabetes, comparable on a sex, age, degree of a cataract and accompanying pathology except diabetes. To all patients spent phacoemulsification with IOL implantation. An inflammation investigated before operation and for 1st, 4th and 10th day after operation. Spent an estimation in points, definition of cornea thickness in the central zone on Visante OCT and defined visus. Results: the inflammation after phacoemulsification at patients with diabetes is more than at patients without diabetes. It is shown in intensifying of a clinical picture of an inflammation, augmentation of cornea thickness in the postoperative period and lower visual functions at early stages after operation.

Известно, что хирургическая травма приводит к выбросу провоспалительных агентов, что в свою очередь проявляется развитием послеоперационной

эксудативно-воспалительной реакции (ПЭВР), имеющей защитную функцию [1]. Однако, в случае операций по поводу катаракты, данная послеоперационная реакция явля-