

6. Slobodian K.V. The role of prostaglandin E₂ in excretion of osmotically concentrated urine under the 3 % solution of sodium chloride loading in intact mature rats. *Bukovinian Medical Herald* 2008; 12(3): 77-80.

7. Cogan M.G. Angiotensin II: a powerful controller of sodium transport

in the early proximal tubule. *Hypertension* 1990; 15(5): 451-458.

8. Glodny B. The vasodepressor function of the kidney: Prostaglandin E₂ is not the principal vasodepressor lipid of the renal medulla. *Acta physiol. Scand.* 2006; 3: 419-429.

9. Jucknevicus I., Segal Y., Kren S. et al. Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am. J. Physiol.* 2004; 286(6): 1059-1062.

10. Wong P.S.K. The action of angiotensin II on the intracellular sodium content of suspensions of rat proximal tubules. *J. Physiol.* 1996; 497(1): 219-227.

Надійшла 4.10.2012

УДК 616.37-002-036.11

В. О. Полясний

СТИМУЛЬОВАНА ЛІПОПОЛІСАХАРИДОМ АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ КЕТОГЕННОЇ ДІЄТИ У КІНДЛІНГОВИХ ЩУРІВ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.37-002-036.11

В. А. Полясний

СТИМУЛИРОВАННАЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ УСЛОВИИ ПРИМЕНЕНИЯ КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ У КИНДЛИНГОВЫХ КРЫС

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Через 4 нед. с момента воспроизведения коразолового киндлинга у крыс наблюдается увеличение выраженности реакции бластной трансформации, вызванной бактериальным липополисахаридом. Содержание киндлинговых крыс на кетогенной диете (80 % липидов, а также 3,3 % углеводов и 16,7 % белков) вызвало уменьшение выраженности стимулированной бактериальным липополисахаридом пролиферативной активности лимфоцитов.

Ключевые слова: эпилептический синдром, киндлинг, реакция бласттрансформации лимфоцитов, кетогенная диета.

UDC 616.37-002-036.11

V. O. Polyasny

LIPOPOLYSACCHARIDE STIMULATED LYMPHOCYTE ACTIVITY UNDER CONDITIONS OF KETOGENIC DIET USAGE IN KINDLED RATS

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Objective. To investigate the blast-transforming lymphocyte reaction in postponed period of corazol kindling in rats and peculiarities of that reaction under conditions of ketogenic diet usage.

Materials and methods. In ficoll-verographin gradient of density the mononuclear cells have been collected, which have been primed with lipopolysaccharide (LPS) *E. coli*. The index of activation of lymphocytes (IAL) was calculated in accordance to equation: IAL= O/K, where O-blast cells (in %) in samples, which contained both activated by LPS monocytes and phytohemagglutinin (PhHA) stimulated lymphocytes; K-blast cells in samples, which contained intact monocytes and PhHA-stimulated lymphocytes. IAL was determined in blood of corazol-kindled rats in two and four weeks of their being on ketogenic diet (KD) (80% lipids, 3.3% carbohydrates and 16.7% proteins).

Results. Incubation of lymphocytes with LPS during 1,5 h was followed by the increase of blast cells, and their number in control was (59.5±4.7)%, while in kindled rats — 83.7%. IAL was 1.47 and 5.13 correspondently (P<0.05). The number of blast cells in rats, which have been given KD during two weeks was 45.3%, while in kindled rats it was 62.4%. IAL was equal to 0.76 and 1.66 correspondently (P<0.05). Those indices were significantly less when compared with groups of kindled rats, which were not given KD (P<0.05). Maintenance of rats on KD during four weeks was followed the net decrease of blast cells in control and experimental groups up to 41.2 and 48.5%. IAL was also reduced up to 0.7 and 0.95 (P>0.05).

Conclusions. The heightening of LPS-induced blast transformation of lymphocytes is observed in postponed period of kindling and this effect is blocked by KD.

Key words: epileptic syndrome, kindling, blast transformation of lymphocytes, ketogenic diet.

Вступ

Установлено взаємну залежність проявів хронічного епілептогенезу та стану імунологічної реактивності [3]. Зокре-

ма той факт, що виникнення та розвиток кіндлінгового синдрому відбувається за умов підвищення рівня прозапальних цитокінів крові — фактора некрозу пухлин альфа (ФНП-альфа)

й інтерлейкіну 1 бета (ІЛ-1-бета) [3]. Указані цитокіни опосередковують широкий спектр змін в організмі при розвитку запального процесу, продукуються в основному моноцити



та макрофаги, а також Т- та В-лімфоцити, деякі інші клітини [7]. Зважаючи на роль ІЛ-1-бета у формуванні імунної відповіді, запропоновано використовувати індекс стимульованої проліферації лімфоцитів (ІСПЛ) як показник здатності мононуклеарних клітин продукувати ІЛ-1-бета [1].

За умов розвиненого кіндлінгу встановлено пригнічення реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) у ранньому післянападному періоді, що може бути результатом активації ендогенної опіатної системи [2]. Разом із тим, кіндлінг має бути асоційованим з високим рівнем бласттрансформації, що впливає з патогенетичної ролі ІЛ-1-бета при виникненні кіндлінгу, зокрема, його резистивної до антиепілептичної терапії форми [3].

Метою цього дослідження було вивчення показника ІСПЛ у щурів з відтермінованим у часі викликаним введеннями коразолу кіндлінгом. Додаткове завдання роботи полягало у вивченні особливостей ІСПЛ за умов застосування кетогенної дієти (КД), яка пригнічує резистивні форми епілептичного синдрому, а також знижує активність прозапальної системи цитокінів [9].

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведені за умов гострого експерименту на щурах-самцях лінії Вістар масою 180–270 г. Спостереження здійснювали у відповідності до вимог GLP і комісії з біоетики Одеського національного медичного університету (протокол № 84 від 10 жовтня 2008 р.).

Кіндлінг відтворювали за допомогою повторних введень підпорогової дози коразолу (25,0 мг/кг, внутрішньоочеревинно) протягом 3 тиж. [2; 4–6]. У дослідженні спостерігали щурів, у яких останні три ін'єкції епілептогену супроводжувалися генералізованими кло-

ніко-тонічними нападами (усього 35 тварин).

Кетогенна дієта включала 80 % ліпідів, а також 3,3 % вуглеводів і 16,7 % білків [8]. Щурів з кіндлінг-синдромом утримували на КД тривалістю 2 та 4 тиж. У першій групі КД розпочинали через 2 тиж. з моменту відтворення кіндлінгу, а у другій — наступної доби. Таким чином, в обох групах дослідження проводили через 4 тиж. з моменту відтворення кіндлінгу. Подібна перерва є достатньою для виникнення резистентного до лікування судомного синдрому [3]. Групами контролю слугували інтактні щури, яких утримували на КД 2 та 4 тиж.

Для дослідження імунологічних показників у щурів брали кров із хвостової вени. У градієнті фікол-верографіну 1,077 («Реакомплекс», Російська Федерація) виділяли мононуклеарні клітини [1]. Для розподілу клітин, які мають здатність до прилипання, від таких, що її не мають, суспензію клітин з концентрацією мононуклеарних клітин $2 \cdot 10^6$ на 1 мл культуральної речовини RPMI = 1640 з 10 % інактивованої сироватки АВ (IV) розливали по 0,2 мл у комірочки пластикових плоскодонних планшетів і культивували протягом 45 хв при 37 °С і 5 % вмісті CO₂. Потім збирали клітини, які не прилипли до стінок (94 % лімфоцитів), і зберігали при 4 °С до моменту використання. Клітини, які прилипли (понад 90 % моноцитів), обережно промивали кілька разів культуральною рідиною 199. У всі комірочки додавали по 0,1 мл рідини RPMI-1640, яка містила 0,1 % поліетиленгліколю (ПЕГ-6000 “РАА”, Австрія) і 50 мкг/мл гентаміцину. Клітини активували ліпополісахаридом (ЛПС) *E. coli* 055 (“Omni-pharm”, Російська Федерація) імпульсним методом. Для цього до частини комірок з моноцитами вносили по 0,02 (20 мкг/мл) ЛПС, до решти — по 0,02 мл рідини RPMI-1640 та інкубували при

37 °С і 5 % вмісті CO₂ протягом різних інтервалів часу (0,5 і 1,5 год) [1]. Після закінчення культивування відсмоктували усю рідину, а комірочки з клітинами промивали розчином 199. Потім до моношару моноцитів додавали по 0,2 мл клітин, які не прилипли (лімфоцитів), у концентрації $2 \cdot 10^6$ /мл рідини PM-1640 з 20 мМ глутаміну, 10 % інактивованої АВ (IV) сироватки крові та 50 мкг/мл гентаміцину. В отриману суміш клітин, яка містила як активовані, так і інтактні моноцити та лімфоцити, додавали субоптимальну дозу (1 мкг/мл) фітогемаглютиніну (ФГА, “РАА”, Австрія) в об'ємі 0,02 мл. Планшети розміщували в термостаті при 37 °С з 5 % вмістом CO₂ і культивували їх протягом 72 год. Після закінчення РБТЛ готували мазки, у яких морфологічно визначали кількість баластних клітин.

Активність ІЛ-1 виражали ІСПЛ, який визначали за формулою [1]:

$$\text{ІСПЛ} = \text{О/К},$$

де О — вміст бластних клітин (%) у пробах, які містять моноцити, активовані ЛПС, і ФГА-стимульовані лімфоцити; К — вміст бластних клітин (%) у пробах, які містять неактивовані (інтактні) моноцити і ФГА-стимульовані лімфоцити.

Отримані результати обробляли статистично з використанням загальноприйнятих у медико-біологічних дослідженнях критеріїв оцінки відмінностей між групами.

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження РБТЛ у інтактних щурів, проведене при 30-хвилинній інкубації з ЛПС, засвідчило наявність ($22,7 \pm 2,6$) % баластних клітин, тимчасом як у щурів з кіндлінгом цей показник становив ($26,7 \pm 3,1$) %. Показники ІСПЛ відповідно дорівнювали 0,29 та 0,36 ($P > 0,05$) (рис. 1). Аналогічне дослідження при інкуба-



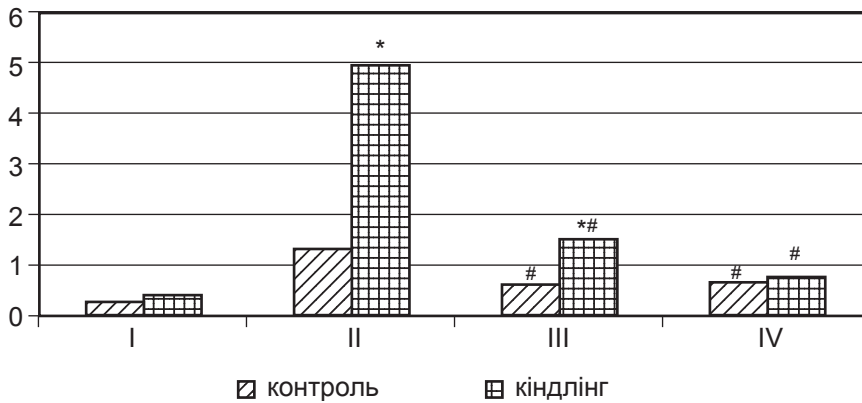


Рис. 1. Індекс стимульованої проліферації лімфоцитів за умов утримання кіндлінгових щурів на кетогенній дієті. За віссю абсцис: I і II — інкубація з ліпополісахаридом тривалістю відповідно 0,5 та 1,5 год; III — два, IV — чотири тижні утримання щурів на кетогенній дієті; * — $P < 0,05$ порівняно з відповідним показником у групі контролю; # — $P < 0,05$ порівняно з відповідним показником у групі кіндлінгових щурів без кетогенної дієти

ції з ЛПС тривалістю 1,5 год супроводжувалося збільшенням кількості клітин з РБТЛ: у групі контролю відповідний показник становив 59,5 %, а у щурів із кіндлінг-синдромом — 83,7 %. Відповідно ІСПЛ дорівнював 1,47 та 5,13 ($P < 0,05$). При цьому показники ІСПЛ достовірно перевищували такі, що реєструвались у відповідних групах при 30-хвилинній інкубації з ЛПС ($P < 0,05$). Кількість баластних клітин у щурів, яких утримували протягом 2 тиж. на КД (група контролю), сягала 45,3 %, тимчасом як у групі кіндлінгових щурів їх кількість дорівнювала 62,4 %. Відповідно ІСПЛ дорівнював 0,76 та 1,66, що було достовірно менше, порівняно з показниками у кіндлінгових щурів без утримання на КД ($P < 0,05$). При цьому показник ІСПЛ, який реєструвався у кіндлінгових щурів, перевищував такий, який зареєстровано у щурів групи контролю ($P < 0,05$). Утримання щурів на КД протягом 4 тиж. супроводжувалося зменшенням кількості баластних клітин за умов інкубації з ЛПС тривалістю 1,5 год відповідно до 41,2 та 48,5 %. При цьому ІСПЛ також зменшувався до 0,7 і 0,95 ($P > 0,05$) (див. рис. 1).

Отже, проведене дослідження показало, що за умов

кіндлінгу, який є відтермінованим у часі, спостерігається підвищення здатності лімфоцитів крові до реакції бласттрансформації, стимульованої бактеріальним ліпополісахаридом. Цей результат збігається з раніше встановленою патогенетичною роллю, яку виконує ІЛ-1-бета в механізмах розвитку як хронічного епілептичного синдрому, так і власне резистентності судом до впливу протиепілептичних чинників [2].

Разом із тим, встановлено, що застосування КД у щурів із розвиненим кіндлінгом запобігає виникненню схильності лімфоцитів до бласттрансформації, що також узгоджується з даними [7], які на моделі спадкової форми розсіяного склерозу у мишей установили зменшення проліферативної здатності лімфоцитів за умов застосування КД. Нейропротекторні властивості КД також встановлено щодо експериментальної спадкової моделі хвороби Альцгеймера — показано пригнічення утворення амілоїдних білків бета типу — 40 та 42 у мозку мишей [7], а також трансгенної експериментальної моделі аміотрофічного латерального склерозу — під впливом КД встановлено відновлення порушень рухової активності у мишей [7]. Крім того, як озна-

ки запалення, так і больові відчуття, викликані термічним подразником, значно зменшуються за умов застосування КД [9]. Одним із можливих механізмів реалізації вказаних ефектів КД може бути зниження продукції перекисних сполук за рахунок збільшення експресії активності мітохондріальних незв'язаних протеїнів [9].

У проведених нами дослідженнях показано, що на тлі застосування КД зменшуються прояви агресивності, відновлюються показники порушеного циклу неспання — спання у кіндлінгових щурів [4]. Указані лікувальні впливи відбуваються за умов активації ендогенної опіатної системи [5], а також підвищення антиоксидантного потенціалу тіол-дисульфідної системи крові [6]. Можна вважати, що застосування КД є перспективним методом корекції багатьох форм невропатологічних синдромів, а також порушень стану імунологічної реактивності організму.

Висновки

1. У відтермінованому за часом коразол-індукованому кіндлінгу спостерігається збільшення стимульованої бактеріальним ліпополісахаридом проліферативної активності лімфоцитів крові.

2. Застосування кетогенної дієти сприяє зменшенню бластогенних ефектів бактеріального ліпополісахариду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Адаменко Г. П. Метод определения интерлейкина-1 в культуре лимфоцитов и активированных импульсным способом моноцитов крови человека / Г. П. Адаменко // Лабораторное дело. — 1990. — № 5. — С. 42–45.

2. Изменения бластной трансформации лимфоцитов при киндлинге, вызванном применением пикротоксина у крыс / А. И. Брусенцов, В. В. Мороз, С. А. Супрун [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 1998. — Т. 84, № 3. — С. 233–237.

3. Моделирование и механизмы подавления экспериментального эпи-



лептического синдрома / Л. С. Годлевский, Е. В. Кобелев, В. Ф. Мустяца, Г. А. Дроздова. – Одесса : КП ОГТ, 2010. – 350 с.

4. Полясный В. А. Особенности агрессивного поведения при киндлинге в условиях применения кетогенной диеты и модификации продукции оксида азота / В. А. Полясный // Досягнення біології та медицини. – 2012. – № 1 (19). – С. 78–80.

5. Полясный В. А. Опиатергические механизмы изменений спонтанной и вызванной двигательной активности киндлинговых крыс в условиях применения кетогенной диеты / В. А. Полясный // Інтегративна антропология. – 2012. – № 1 (19). – С. 45–49.

6. Полясный В. А. Состояние тиол-дисульфидной системы в условиях применения кетогенной диеты у киндлинговых крыс / В. А. Полясный // Кубанский научный медицинский вестник. – № 2 (131). – 2012. – С. 151–154.

7. Inflammation-Mediated Memory Dysfunction and Effects of a Ketogenic Diet in a Murine Model of Multiple Sclerosis / D. Y. Kim, J. Hao, R. Liu [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7 (5):

e35476. doi:10.1371/journal.pone.0035476)

8. Ketogenic diet: effects on expression of kindled seizures and behavior in adult rats / A. Hori, P. Tandon, G. L. Holmes, C. E. Stafstorm // Epilepsia. – 1997. – Vol. 38, N 7. – P. 750–758.

9. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects / J. Freeman, P. Veggiotti, G. Lanzi [et al.] // Epilepsy Res. – 2006. – Vol. 68. – P. 145–180.

REFERENCES

1. Adamenko G.P. Method of interleukin-1 determination in cultured lymphocytes and activated with impulsive method of activation human monocytes. *Laboratornoe Delo* 1990; 5: 42-45.

2. Brusentsov A.I., Moroz V.V., Suprun S.A. et al. Changing of lymphocytes blast transformation reaction in rats kindled with picrotoxin administration. *Russian Physiological Journal after I.M.Sechenov* 1998; 84, 3: 233-237.

3. Godlevsky L.S., Kobolev E.V., Mustyatsa V.F., Drozdova G.A. Modeling and mechanisms of suppression of experimental epileptic syndrom. Odessa: KP OGT. 2010. 350 p.

4. Polyasny V.A. Peculiarities of aggressive kindling behavior under conditions of ketogenic diet usage and nitrogen oxide production modification. *Dosiagn. biolog. ta meditsiny* 2012; 1(19): 78-80

5. Polyasny V.A. Opiatergic mechanisms of spontaneous and iducible locomotopr activity changing in kindled rats under conditions of ketogenic diet usage. *Integrativn. antropologia* 2012. 1(19): 45-49.

6. Polyasny V.A. Thiol-disulfide system under conditions of ketogenic diet application to kindled rats. *Kubansk nauchn. med. vestnik* 2012; 2(131): 151-154.

7. Kim D.Y., Hao J., Liu R. et al. Inflammation-Mediated Memory Dysfunction and Effects of a Ketogenic Diet in a Murine Model of Multiple Sclerosis PLoS ONE. 2012; 7(5): e35476. doi: 10.1371journal.pone.0035476)

8. Hori A., Tandon P., Holmes G.L., Stafstorm C.E. Ketogenic diet: effects on expression of kindled seizures and behavior in adult rats. *Epilepsia* 1997; 38(07): 750-758.

9. Freeman J., Veggiotti P., Lanzi G. et al. The ketogenic diet: from molecular mechanisms to clinical effects. *Epilepsy Res* 2006; 68: 145-180.

Надійшла 21.01.2013

Передплачуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

