



В.А. Полясный

КИНДЛИНГ-ПРОВОЦИРОВАННЫЕ СТРЕССОРНЫЕ НАРУШЕНИЯ СО СТОРОНЫ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ И НАДПОЧЕЧНИКОВ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ

*Одесский национальный медицинский университет
Украина, 65082, г. Одесса, Валиховский пер., 2.*

Цель: изучение проявлений, характерных для стресса, наблюдаемых у животных в процессе формирования киндлингового эпилептического синдрома в условиях применения кетогенной диеты.

Материалы и методы: исследования проведены на крысах, у которых моделировали киндлинг путем повторных введений коразола 25,0 мг/кг, в/бр на протяжении 21 дня.

Результаты: отмечено снижение массы селезенки и тимуса при одновременном возрастании массы надпочечников, утолщении коркового и мозгового слоев. В крови животных отмечается увеличение уровня кортикотропина, кортикостерона и гастрин.

Выводы: показано, что под влиянием кетогенной диеты (80% липидов, 3,35% углеводов и 16,7% протеинов) предупреждается развитие киндлинг-провоцированных нарушений и эти эффекты более выражены при четырехнедельном удерживании животных на кетогенной диете.

Ключевые слова: киндлинг, кетогенная диета, надпочечники, селезенка, тимус, кортикотропин, кортикостерон, гастрин.

V.A. Polyasny

KINDLING- INDUCED STRESS DISTURBANCES OF IMMUNOLOGICAL ORGANS AND SUPRARENAL GLANDS UNDER CONDITIONS OF KETOGENIC DIET USAGE

*Odessa National Medical University,
2 Valikhovskiy lane, Odessa 65082 Ukraine.*

Purpose: To study animal's stress manifestation in the course of formation of a kindling epileptic syndrome in the conditions of application of a ketogenic diet.

Materials and Methods: Experiment was hold on rats which were simulated corazol kindling by 25,0 mg/kg, i.p.daily injection during 21 day

Results: The decreasing of the weight of spleen, thymus along with simultaneous increasing of the weight of suprarenal glands and enlargement of the cortical and medullar layers have been seen. Besides, heightened level of corticotropin, corticosteron and gastrin have been registered in blood.

Summary: It was established that ketogenic diet (80% of lipids, 3,35 carbohydrates and 16,7 % of proteins) prevented kindling-induced deteriorations and this effect was more pronounced in case of four weeks ketogenic diet treatment.

Keywords: kindling, ketogenic diet, suprarenal glands, spleen, thymus, corticotrophin, corticosterone, gastrin.

Введение

Формирование хронической эпилептизации мозга методом киндлинга, основанное на повторных воздействиях первоначально субконвульсивных воздействий, сопряжено с развитием стрессорных нарушений в организме животных [1]. Подобные нарушения проявляются в развитии катаболических эффектов, снижении иммунологической реактивности,

а также увеличении возбудимости структур мозга [1,2]. Одним из методов их коррекции является применение кетогенной диеты (КД), которая обеспечивает противосудорожный эффект [3]. Механизмы, которые ответственны за формирование противосудорожного действия КД, включают активирование эндогенной опиатной системы [4], усиление активности эндогенных лигандов бензодиазепиновых рецепторов [3], а также ГАМКергического торможения, снижение активности прооксидантных ме-



ханизмов, снижение активности системы возбуждающих аминокислот, усиление пуринергической медиации, а также синтеза оксида азота [3]. До последнего времени эффекты КД не исследовались в отношении стресс-обусловленных нарушений в условиях воспроизведения фармакологического киндлинга.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение проявлений, характерных для стресса, наблюдаемых у животных в процессе формирования киндлингового эпилептического синдрома в условиях применения кетогенной диеты.

Материалы и методы

Исследования проведены в условиях хронического эксперимента на крысах – самцах линии Вистар массой 180-250 г., которые содержались в стандартных условиях вивария ОНМедУ. Исследования проводили в соответствии с требованиями GLP и комиссии биоэтики ОНМедУ (протокол № 84 от 10 октября 2008 г.). Киндлинг воспроизводили путем ежедневных введений коразола в подпороговой дозе (25,0 мг/кг, в/бр) [1]. Всего осуществляли 21 инъекцию эпилептогена. В наблюдении исследовали тех животных, у которых последние три инъекции эпилептогена вызывали генерализованные клонико-тонические судорожные приступы.

В отдельных группах наблюдения проводили введение коразола на фоне применения КД. КД включала 80% липидов, а также 3,3% углеводов и 16,7 % белков [3, 5]. На 15-е и 29-е сутки с момента начала КД и через 24 часа с момента последнего 21-го применения коразола исследо-

вали морфометрические показатели и измеряли уровень гормонов крови. Группой контроля служили киндлинговые животные, которые в течение аналогичного срока находились в обычных условиях содержания и кормления.

Определение уровня гормонов в сыворотке крови производили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, РФ).

Эвтаназию животных осуществляли путем в/бр применением нембутала (100,0 мг/кг). После тщательного отсепаарывания от окружающих тканей производили взвешивание тимуса, селезенки, а также левого и правого надпочечников. Надпочечники, использовавшиеся для приготовления срезов, окрашенных гематоксилин-эозином, фиксировали в 10% нейтральном формалине. Измерения толщины коркового и мозгового слоев проводили с помощью окуляр-микрометра.

Результаты исследований обрабатывали статистически с применением общепринятых в медико-биологических исследованиях критериев ANOVA+ Newmann- Keuls.

Результаты и обсуждение

Исследование морфометрических изменений иммунокомпетентных органов показало, что под влиянием стресса отмечалось увеличение массы левого и правого надпочечников - соответственно на 41,3 и 32,8% в сравнении с контролем ($P<0,05$). При этом также имело место снижение массы селезенки и тимуса соответственно на 20,9% и 26,9% ($P<0,05$) (Табл. 1).

Таблица 1.

Динамика изменений массы надпочечников и иммунокомпетентных органов киндлинговых крыс в условиях применения кетогенной диеты (M±m)

№ п/п	Группы животных	Число крыс	Надпочечник (мг)		Селезенка (мг)	Тимус (мг)
			Левый	Правый		
1	Интактные крысы+ физ. р-р	10	12,1+ 0,4	12,5+ 0,4	345,3+ 11,2	144,7+ 7,5
2	Киндлинг	14	17,1+ 0,6 #	16,6+ 0,6 #	273,2+ 10,1 #	105,8+ 6,8 #
3	Киндлинг+ КД (2 недели)	12	15,9+ 0,7 #	15,5+ 0,5 #	307,3+ 8,7	113,8+ 5,5 #
4	Киндлинг+ КД (4 недели)	11	12,3+ 0,5 *	12,8+ 0,5 *	360,5+ 11,3 *	135,3+ 9,4 *

Примечание: # - $P<0,05$ в сравнении с группой № 1; * - $P<0,05$ в сравнении с группой № 2.

В группе животных, которых удерживали на КД в течение двух недель, масса левого и правого надпочечников была больше таковой в группе интактных животных соответственно на 31,4% и 24,0% ($P<0,05$). Масса селезенки снижалась на 11,0% и при этом была на 12,5% меньше, чем у киндлинговых крыс ($P>0,05$). Масса тимуса в условиях двухнедельного применения КД была меньше таковой в группе интактных животных на 21,4% и больше, чем у крыс с одним только киндлингом, на 7,6% ($P>0,05$) (Табл.1). В условиях четырехнедельного удерживания животных на КД масса надпочечников незначительно (соответственно на 1,6% и 2,4%) возрастала в сравнении с таковой в группе интактных животных ($P>0,05$). При этом масса селезенки на 4,4% превышала таковую в контроле, а масса тимуса была на 6,5% меньше ($P>0,05$). Все указанные показатели были достоверно меньше таковых у крыс

с развившимся киндлингом в отсутствие применения КД ($P<0,05$).

В условиях сформированного киндлингового синдрома наблюдалось значительное увеличение ширины коркового слоя надпочечника (левый надпочечник) на 19,7%, а также ширины мозгового слоя на 26,3% ($P<0,05$) (Табл. 2). На фоне двухнедельного удерживания животных на КД толщина коркового слоя была больше таковой в группе интактных крыс на 14,6% ($P<0,05$), и при этом данный показатель превышал таковой в группе киндлинговых крыс на 4,3% ($P>0,05$). Толщина мозгового слоя в условиях двухнедельного применения КД превышала таковую в группах интактных животных соответственно на 21,8% ($P<0,05$) и была меньше, чем у крыс с одним киндлингом на 3,5% ($P>0,05$) (Табл. 2). В условиях двухнедельного применения КД толщина коркового слоя была больше та-



ковой в группе интактных крыс на 1,6%, а мозгового - на 4,3% ($P>0,05$). При этом оба показателя были достоверно

меньше, чем у крыс с одним киндлингом (соответственно на 15,1% и 17,4% ($P<0,05$)).

Таблица 2.

Динамика ширины слоев надпочечников киндлинговых крыс в условиях применения кетогенной диеты (М+т)

№ п/п	Группы животных	Число крыс	Корковая зона (мкм)	Мозговое вещество (мкм)
1	Интактные крысы+ физ. р-р	10	702,9+ 25,1	647,2+ 23,4
2	Киндлинг	14	841,5+ 31,2 #	817,2+ 29,4 #
3	Киндлинг+ КД (2 недели)	12	805,3+ 25,1 #	788,3+ 31,2 #
4	Киндлинг+ КД (4 недели)	11	714,3+ 22,6 *	675,3+25,4 *

Примечание: #- $P<0,05$ в сравнении с группой №1; *- $P<0,05$ в сравнении с группой № 2.

У животных с развившимся киндлингом содержание кортикотропина и кортикостерона превышало соответствующие показатели в группе интактных крыс (95,6+ 8,9 пг/мл и 277,5+ 33,5 нмоль/л) соответственно на 47,0% и в 2,4 раза ($P<0,05$) (Рис. 1). Уровень гастрина был выше такового в группе интактных крыс (54,7+ 6,2 пг/мл) в 2,2 раза ($P<0,05$).

Формирование киндлинга у животных, которых удерживали на КД на протяжении двух недель, практически нормализовало содержание кортикотропина, уровень

которого превышал соответствующий показатель у животных контрольной группы на 12,0% ($P>0,05$) (Рис. 1). Уровень кортикостерона, однако, превышал его содержание в группе контроля на 44,0% ($P<0,05$). Также выше контроля было содержание гастрина (на 35,0%) ($P<0,05$). В условиях формирования киндлинга у животных, которых удерживали на КД в течение четырех недель, содержание исследованных гормонов не отличалась от соответствующих данных у животных контрольной группы ($P>0,05$) (Рис. 1).

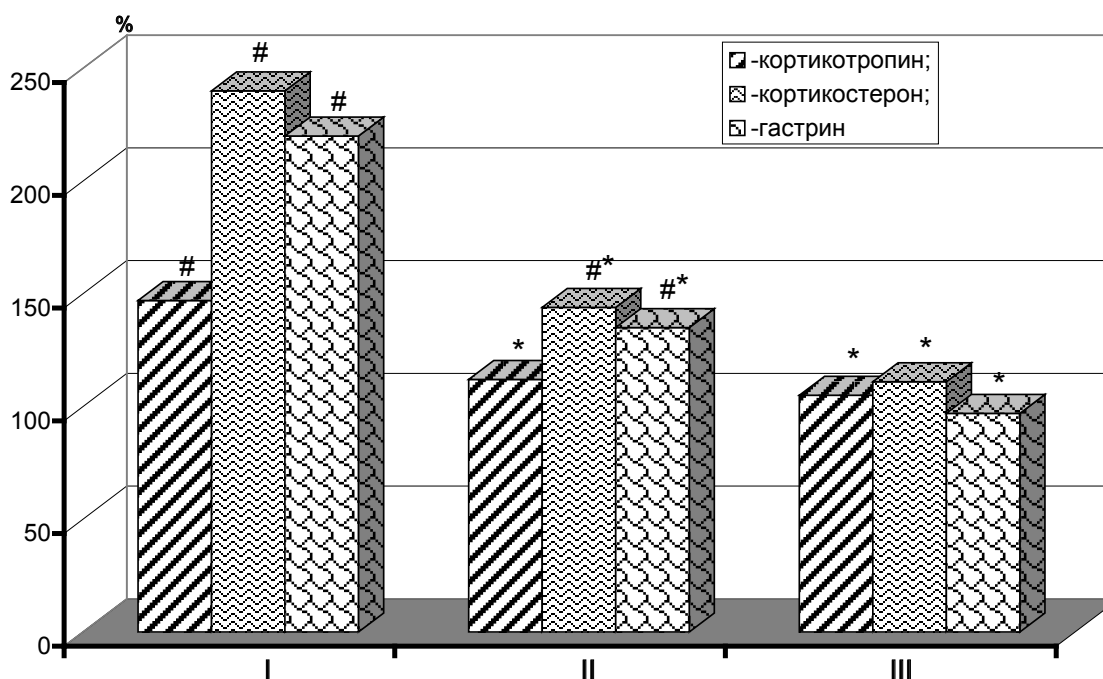


Рис. 1. Динамика уровня гормонов крови у крыс со сформированным киндлинг - синдромом и применением КД.

О б о з н а ч е н и я: по оси абсцисс- I- стресс- провоцированные нарушения уровня гормонов крови; II- и III- применение КД на протяжении двух и четырех недель соответственно.

По оси ординат – исследуемые показатели в % по отношению к в группе контроля (интактные крысы).

P-# <0,05 в сравнении с группой интактных крыс и *- $P<0,05$ в сравнении с группой стрессированных животных (ANOVA+ Newman- Keuls тест).



Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях формирования хронического эпилептического синдрома методом киндлинга у животных реализуются характерные стрессорные нарушения, проявляющиеся в типичных изменениях со стороны надпочечников, увеличении продукции глюкокортикоидных гормонов, уменьшении массы иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки.

В то же время, удерживание животных на КД в течение формирования киндлинга сопровождается стресс-протекторным действием диеты, более выраженным при четырехнедельном периоде ее применения. В основе отмечаемых положительных эффектов КД могут находиться эффекты связанные со снижением уровня провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухолей альфа и интерлейкина-1бета, отмечаемое в условиях применения КД [3]. Как известно, данные цитокины способны неспецифически активировать гипоталамо-гипофизарно – надпочечниковую ось, что инициирует и поддерживает стрессорную реакцию [6]. По-видимому, подобное блокирующее действие лежит в основе показанного в исследовании

уменьшения уровня кортикотропина и кортико-стерона в крови животных.

Механизм снижения уровня гастрина может в большей степени зависеть от реализации местных механизмов патогенеза стрессорных нарушений, реализующихся на уровне регуляции секреторной активности желез желудка. В этом отношении важно подчеркнуть, что КД обеспечивает снижение активности дофаминергических механизмов, высокая активность которых обеспечивает увеличение продукции гастрина [7,8], а также обеспечивает механизмы консолидации иммунного ответа [9]. Можно полагать, что предупреждение гиперактивации катехоламинергических механизмов, вызываемое КД, обеспечивает большую стрессорную устойчивость иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки к стрессорным воздействиям.

Полученные данные эффективности КД в отношении проявлений стрессорных нарушений у животных, наряду с ранее установленной эффективностью в отношении экспериментального судорожного синдрома, позволяют рассматривать КД в качестве средства коррекции эпилептиформных проявлений, оказывающего комплексный терапевтический эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моделирование и механизмы подавления экспериментально эпилептического синдрома/ Л.С.Годлевский, Е.В.Коболев, В.Ф.Мустьяца, Г.А. Дроздова // Одесса: КП ОГТ.- 2010.- 350 с.
2. Amygdaloid kindled seizures can induce functional and pathological changes in thymus of rat: Role of the sympathetic nervous system/ R.Bhatt, S.Bhatt, M.Hameed, P.Rameshwar, A.Siegel// Neurobiology of Disease.- 2006.- Vol.21, N1.- P.127-131.
3. Adenosine, ketogenic diet and epilepsy: the emerging therapeutic relationship between metabolism and brain activity/ Masino S.A., Kawam M., Wasser C.D.et al., // Curr.Neuropharmacol.- 2009.- Vol. 7, N3.- P.257-268
4. Полясный В.А. Опиатергические механизмы изменений спонтанной и вызванной двигательной активности киндлинговых крыс в условиях применения кетогенной диеты // Интегративная антропология- 2012.- №1(12)- С.45-49.
5. Полясный В.А. Усиление противосудорожного действия диазепама под влиянием кетогенной диеты на очаговой модели эпилептической активности// Достижения биологии и медицины.- 2011.- №2(18).- С. 21-24.
6. Effects of pentoxifylline on TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells in patients with nonalcoholic steatohepatitis/ D.G.Duman, F.Ozdemir, E.Birben, et al.// Digestive Diseases and Sciences.- 2007.- Vol.52, N10.- P.2520-2524.
7. Desai J.K. Characterization of dopamine receptor subtypes involved in experimentally induced gastric and duodenal ulcers in rats/ J.K.Desai, R.K.Goyal, N.S.Parmar // J.Pharm.Pharmacol.- 1999.- Vol.51, N2.-P.187-192.
8. High gastrin cell activity and low ghrelin cell activity in high-anxiety Wistar Kyoto rats/ E.Kristensson, M.Sundqvist1, R.Håkanson, E.Lindström// J. Endocrinol.- 2007.- Vol. 193.- P. 245-250
9. Хендерсон. Дж.М. Патология органов пищеварения. Бином- Невский Диалект, Москва – Санкт- Петербург, 1997- 272 с.

ПОСТУПИЛА: 23.05.2012