УДК 612.017.1:612.8.062;612.821.7+616.853

Р.С. Вастьянов, Ю.С. Стрельнікова

Одеський національний медичний університет

ПАТОГЕНЕТИЧНА РОЛЬ СИСТЕМИ ЦИТОКІНІВ ПРИ ХРОНІЧНОМУ СУДОМНОМУ СИНДРОМІ

Наведені дані експериментальних досліджень, що висвітлюють вплив фактора некроза пухлини-α (ФНП) та інтерлейкіну-1β (ІЛ-1) на вираженість кіндлінг-індукованого хронічного судомного синдрому. Обговорюється модулюючий вплив вказаних цитокінів на розвиток і пригнічення судом, зміни концентрації ФНП та ІЛ-1 в крові та тканині мозку при кіндлінговій моделі епілепсії. Показано розвиток протисудомного ефекту при пікротоксиновому кіндлінгу за умов блокади активності інтерлейкінових рецепторів. Зроблено висновок про патогенетичне значення системи цитокінів в епілептогенезі, а також про патофізіологічні механізми хронічного судомного синдрому з точки зору розвитку патологічної дизрегуляційної інтеграції нервової та імунної систем.

Ключові слова: *кіндлінг, цитокіни, фактор некроза пухлини, інтерлейкін-1, рекомбінантний антагоніст інтерлейкін-1 рецепторів, дизрегуляційна патологія.*

Відомі дані стосовно взаємозв'язку дисфункції імунної системи та розвитку епілепсії. Результати клінічних спостережень свідчать про дисфункцію імунної системи у хворих з енцефалітом Расмусена [1] і з синдромом Леннокса–Гасто [2]. У пацієнтів з епілепсією після клоніко-тонічних нападів у лікворі були виявлені підвищені концентрації інтерлейкіну-6 (Indicators of inflammation after recent tonic-clonic epileptic seizures correlate), також зросла концентрація антагоністів щодо рецепторів до інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) [3].

Експериментально відтворений каїнат-індукований епілептичний статус спричиняв зростання внутрішньогіпокампальної експресії мРНК ІЛ-1, фактора некрозу пухлини-α (ФНП) та інших цитокінів [4]. Показано також, що введення ІЛ-1 подовжувало термін маніфестації каїнат-індукованих судом [5]. Обидва цитокіни – ФНП та ІЛ-1 підсилювали вираженість пентиленентетразолових судом в мишей [4].

Ймовірно, що цитокіни здатні модулювати процеси збудливості головного мозку, а також регулювати розвиток судом, розвиток та гибель нейронів, реактивний гліоз та процеси «спрутингу» нервових волокон [6].

Показано, що блокування активності системи (рецепторів) цитокінів справляє позитивні терапевтичні ефекти при енцефаліті Расмусена [7] та нейродегенеративних захворюваннях з аутоімунними механізмами розвитку [8]. Блокада активості ІЛ-1 рецепторів вважається потенціальним терапевтичним заходом при лікуванні епілепсії [9]. Нами проведено низку дослідів, присвячених визначенню патогенетичної ролі цитокінів при хронічному судомному синдромі.

Мета роботи – дослідження патогенетичної ролі системи цитокінів при кіндлінгу. Сформульована мета реалізовувалася шляхом визначення впливу екзогенного введення ФНП на вміст досліджуваних цитокінів в крові та тканині мозку щурів з моделлю хронічного судомного синдрому, а також інтенсивності кіндлінг-спричиненого судомного синдрому при блокаді ІЛ-1 рецепторів.

Матеріал і методи. Дослідження проводилися за умов хронічного експерименту на щурах-самцях лінії Вістар масою від 180 до 250 г відповідно до вимог вітчизняних і міжнародних рекомендацій (Конвенція Ради Європи, 1986; Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.06, №3447-IV), а також комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 28 Д від 09.11.12).

Для відтворення хронічного судомного синдрому використовували модель електро-

© Р.С. Вастьянов, Ю.С. Стрельнікова, 2016

стимуляційного та хімічного кіндлінгу шляхом електричних подразнень мигдалика та 24-добового введення підпорогових доз пікротоксину [10]. В окремих серіях кіндлінговим щурам здійснювали екзогенне введення ФНП в дозі 5,0 мкг/кг. Дослідження вмісту ФНП та ІЛ-1 проводили в крові та тканині мозку щурів, використовуючи метод імуноферментного аналізу із застосуванням селективних антитіл системи Biotrak (Amersham Pharmacia Biotech, США). Кожне визначення проводили двічі. Абсорбцію антитіл проводили при довжині хвили 405 нм. Мінімально визначений рівень дорівнював 4,0 пг/мл. При кожному дослідженні вмісту ІЛ-1 застосовували 0,416 мг тканини в 50 мкл досліджуваного розчину. При дослідженні вмісту ФНП об'єм застосованої тканини був у 10 разів менше.

Рекомбінантний антагоніст ІЛ-1 (РАІЛ; НДІ особливо чистих препаратів, С.-Пб, РФ) при відтворенні кіндлінгу вводили щурам внутрішньоочеревинно дозами 2,5; 5,0; 7,5 та 10,0 мг/кг за 30 хв до введення епілептогену.

Отримані результати обчислювали статистично. Мінімальну статистичну вірогідність визначали при $p<0,05$.

Результати. Судомні реакції у щурів, індуковані тестуючою електричною стимуляцією мигдалика через 24 год після екзогенного введення ФНП, мали характер генералізованих клоніко-тонічних нападів з розвитком післянападової депресії та з вегетативними розладами (табл. 1). Інтенсивність кіндлінгових судом, а також кількість щурів з клоніко-тонічними судомними нападами за таких умов суттєво перевищували такі в групі кіндлінгових щурів без введення ФНП (в обох випадках $p<0,05$). Тривалість кіндлінг-індукованої епілептиформної активності була вдвічі більше, ніж в групі кіндлінгових щурів без введення ФНП ($p<0,001$).

При вивченні концентрації ФНП в крові та тканині мозку кіндлінгових щурів до та після екзогенного введення досліджуваного цитокіну виявилося його суттєве зростання в крові (в 6,3 раза, $p<0,01$), рис. 1. Введення

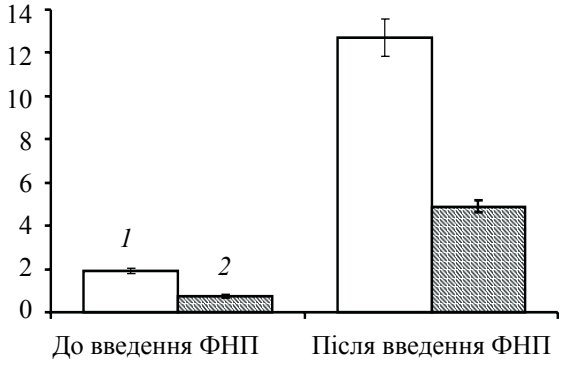

Рис. 1. Вплив внутрішньоочеревинного уведення ФНП (5,0 мкг/кг) на вміст ФНП (*1*) та ІЛ-1 (*2*) в крові кіндлінгових щурів. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими у кіндлінгових щурів до введення ФНП

ФНП супроводжується значним (в 1,9 раза, $p<0,01$) зростанням його вмісту в тканині мозку (рис. 2). За цих умов було виявлено

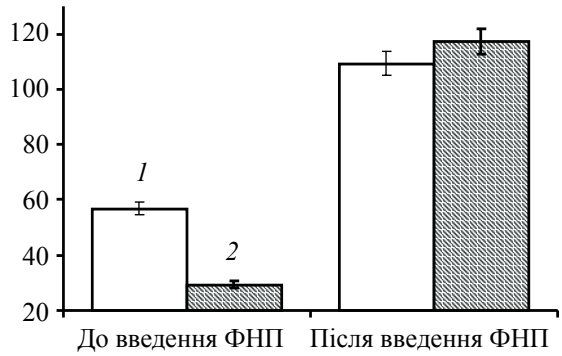

Рис. 2. Вплив внутрішньоочеревинного уведення ФНП (5,0 мкг/кг) на вміст ФНП (*1*) та ІЛ-1 (*2*) в тканині мозку кіндлінгових щурів. ** $p<0,01$ – вірогідні розбіжності досліджуваних показників порівняно з такими у кіндлінгових щурів до введення ФНП

аналогічне зростання концентрації ІЛ-1 в крові та мозку кіндлінгових щурів ($p<0,05$).

Таблиця 1. Вплив внутрішньоочеревинного введення ФНП (5,0 мкг/кг) на судомні реакції щурів з електричним кіндлінгом мигдалика

Група щурів (n)	Число щурів з судомами інтенсивністю						Тривалість кіндлінг-індукованої епілептиформної активності, (M±m) с
	0	1	2	3	4	5	
Кіндлінг (11)	0	0	0	0	7	4	47,3±5,3
Кіндлінг + ФНП (9)	0	0	0	0	2#	7#	92,5±10,5***

Примітка. # $p<0,05$; *** $p<0,001$ – вірогідні розбіжності показника порівняно з таким у кіндлінгових щурів без уведення ФНП.

За умов блокади ІЛ-1 рецепторів введенням РАІЛ суттєве зменшення інтенсивности кіндлінг-спричинених судом реєструвалося лише при введенні сполуки максимальною дозою. Генералізовані судомні напади при цьому відзначали у 50 % щурів, повторних нападів не було ($p<0,05$), табл. 2. Введення РАІЛ в дозі

тривалість генерації спайк-хвильових потенціалів впродовж перших 5 год з моменту введення. Активність мозку тварин реєструвалася протягом 72 год, і тривалість генерації спайк-хвильових потенціалів впродовж 7-ї – 18-ї годин з моменту введення зростала також під впливом іншого цитокіну – ФНП [11].

Таблиця 2. Вплив внутрішньоочеревинного введення РАІЛ на вираженість пікротоксин-індукованих судом кіндлінгових щурів

Група щурів (n=6)	Число щурів з судомами інтенсивністю						Латентний період судомних реакцій, (M±m) с
	0	1	2	3	4	5	
Кіндлінг (11)	0	0	0	0	4	2	9,8±0,9
Кіндлінг + РАІЛ (2,5 мг/кг)	0	0	0	0	4	2	10,3±1,1
Кіндлінг + РАІЛ (5,0 мг/кг)	0	0	0	0	3	3	9,6±0,9
Кіндлінг + РАІЛ (7,5 мг/кг)	0	0	0	0	5	1	9,9±0,9
Кіндлінг + РАІЛ (10 мг/кг)	0	0	0	3	3	0	13,2±0,9*

Примітка. * $p<0,05$ – порівняно з контролем і з даними кіндлінгових щурів без введення РАІЛ.

10 мг/кг спричиняло суттєве (на 34,7 %) подовження латентного періоду перших судомних реакцій відповідно такого показника в контролі ($p<0,05$).

Обговорення результатів. Отримані результати свідчать про істотне збільшення концентрації досліджуваних цитокінів в мозку і плазмі крові у щурів з кіндлінгом мигдалика. До цього слід додати результати щодо зміни рівней ФНП у щурів лінії WAG/Rij, генетично схильних до абсансних судом, у віці 2–6 місяців [11]. Виявлено, що в мозку щурів WAG/Rij віком 2 місяці вміст досліджуваного цитокіну не відрізнявся від аналогічних даних у контрольних щурів лінії ACI. Проте в мозку тих же самих щурів віком 4 місяці рівень ФНП збільшився на 24 %, при цьому аналогічні показники в мозку щурів контрольної групи зменшилися на 12 %. На 6-му місяці життя рівень ФНП не змінювався. Враховуючи, що у щурів лінії WAG/Rij максимальна виразність абсансних судом відбувається саме у віці 2–4 місяці, ймовірно, що за умов генетичної моделі генералізованих абсансних судом показано співпадання зростання вмісту ФНП із інтенсивністю судомного синдрому, що свідчить про просудомну роль зазначеного цитокіну.

Ці дані узгоджуються з результатами серій дослідів щодо вивчення впливу екзогенно введеного ІЛ-1 на тривалість генерації спайк-хвильових потенціалів в умовах експериментальної генетично детермінованої моделі абсансної епілепсії. Введений інтактним щурам лінії WAG/Rij цитокін збільшував

Проведені дослідження виявили істотне збільшення концентрації ФНП в мозку і плазмі крові у щурів з кіндлінгом мигдалика. Отримані дані свідчать про суттєві порушення регуляторних процесів в нервовій і імунній системах при хронічній епілептичній активності (ЕпА), що є додатковим доказом формування дезінтеграційної патології за досліджених умов. Вважаємо, що за умов індукованої хронічним судомним синдромом дезінтеграції ЦНС відбувається суттєва компенсаторна активація імунної системи, проявом якої є власне вивільнення цитокінів.

Просудомні ефекти досліджених цитокінів, скоріше за все, пов'язані з полегшенням процесу розповсюдження ЕпА, але не зі зниженням порогу виникнення судомного синдрому. Показано схожі концентрації ФНП за умов амігдалярного кіндлінгу в корі мозку і ділянках лімбічної системи, які відомі зниженим порогом ініціації судомних реакцій, а також в тканині мозочка [12], і свідчать, можливо, про залучення вказаних утворень мозку до процесу формування кіндлінгових судом.

В цьому аспекті інтересними є дані стосовно протисудомних ефектів, які були відзначені при блокаді інтерлейкінових рецепторів. Зазначимо, що в цьому разі протисудомний ефект, виражений зменшенням інтенсивності судом і подовженням їх латентного періоду, був досягнутий при введенні сполуки максимальною дозою. Вважаємо принциповим отриманий результат пригнічення хронічного судомного синдрому за умов блокади активності інтерлейкінових

рецепторів. Схожі дані розвитку протисудомної дії при введенні РАІЛ в дозі 10 мг/кг були отримані за умов гострих генералізованих судом, індукованих конвульсантами з різним механізмом реалізації конвульсивної дії [13]. Інакше кажучи, модуляція активності системи прозапальних цитокінів висвітлює патогенетичну їх важливість при судомному синдромі.

Висновки

1. Розвиток хронічного судомного синдрому відбувається за участю імунної системи, а саме представників сімейства прозапальних цитокінів фактора некрозу пухлини-α та інтерлейкіну-1β.

2. Екзогенне введення фактора некрозу пухлини-α кіндлінговим щурам спричиняє просудомний ефект із розвитком генералізованих клоніко-тонічних повторних нападів, збільшенням його концентрації в крові та тканині мозку, а також збільшенням вмісту IL-1β в крові та тканині мозку.

3. При блокаді рецепторів ІЛ-1β введенням РАІЛ відбувається протисудомний ефект в умовах кіндлінг-індукованої хронічної епілептичної активності.

4. Одним із провідних патофізіологічних механізмів хронічного судомного синдрому є формування патологічної дизрегуляційної інтеграції нервової та імунної систем.

Перспективність дослідження. Отримані дані мають важливе значення для визначення фундаментальних механізмів епілептогенезу з точки зору залучення до патогенетичних механізмів системи цитокінів. У цьому аспекті отримані лише перші результати, які потребують аналізу, подальшої перевірки, у тому числі й на інших моделях судомного синдрому.

Доведене посилення вираженості кіндлінгових судом під впливом ФНП свідчить на користь того, що ця сполука порушує перш за все центральні механізми генерування судом. Проте остаточно питання щодо первинності епілептогеннної дії ФНП в мозку або крові ще не вирішене. Більш того, показані центральні ефекти досліджуваного цитокіну після його внутрішньоочеревинного введення свідчать про факт його проникності крізь гематоенцефалічний бар'єр при кіндлінгових судомах, що підтверджує припущення стосовно взаємозв'язку запалення і судом, з одного боку, і порушення проникненості гематоенцефалічного бар'єра і судом – з іншого.

Механізми розвитку протисудомної дії за умов блокади інтерлейкінових рецепторів також потребують ретельної перевірки та уточнення, проте йдеться про перспективи експериментального обгрунтування доцільності клінічного тестування сполук у хворих на епілепсію, механізмом реалізації ефекту яких є блокада активності імунної системи та/або системи цитокінів.

Література

1. *Tumani H.* Biochemical markers of autoimmune diseases of the nervous system / H. Tumani, J. Brettschneider // Curr. Pharm. Des. – 2012. – Vol. 18, № 29. – P. 4556–4563.

2. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy / S. Morichi, Y. Kashiwagi, K. Takekuma et al. // Int. J. Neurosci. – 2013. – Vol. 123, № 1. – P. 17–23.

3. Interleukin-6 and Interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures / J. Peltola, J. Palmio, L. Korhonen et al. // Epilepsy Res. – 2000. – Vol. 41. – P. 205–211.

4. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus / M.G. De Simoni, C. Perego, T. Ravizza et al. // Eur. J. Neurosci. – 2000. – Vol. 12. – P. 2623–2633.

5. *Ravizza T.* Status epilepticus induces time-dependent neuronal and estrocytic expression of IL-1 receptor type-I in the rat limbic system / T. Ravizza, A. Vezzani // Neurosci. – 2006. – Vol. 137, № 1. – P. 301–308.

6. *Jankowsky J.L.* Cytokine responses to LTP induction in the rat hippocampus: a comparison of in vitro and in vivo techniques / J.L. Jankowsky, B.E. Derrick, P.H. Patterson // Learn. Mem. – 2000. – Vol. 7, № 6. – P. 400–412.

7. Rasmussen's encephalitis: clinical features, pathobiology, and treatment advances / S. Varadkar, C.G. Bien, C.A. Kruse, et al. // Lancet Neurol. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 195–205.

8. *Matikainen S.* Role of cytokines and their blocking in immune-mediated inflammatory diseases / S. Matikainen, S. Jokiranta, K.K. Eklund // Duodecim. – 2016. – Vol. 132, № 4. – P. 349–354.

9. ICE/caspase 1 inhibitors and IL-1beta receptor antagonists as potential therapeutics in epilepsy / A. Vezzani, S. Balosso, M. Maroso, et al. // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 43–50.

10. *Шандра А.А.* Киндлинг и эпилептическая активность / А.А. Шандра, Л. С. Годлевский, А. И. Брусенцов. – Одесса: Астропринт, 1999. – 191 с.

11. Cytokines and absence seizures in a genetic rat model / G. van Luijtelaar, S. Lyashenko, R. Vastyanov, et al. // Neurophysiology. – 2012. – Vol. 43, № 6. – P. 478–486.

12. TNF-alpha in cerebral cortex and cerebellum is affected by amygdalar kindling but not by stimulation of cerebellum / L.S. Godlevsky, A.A. Shandra, A.A. Oleinik, et al. // Pol. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 54, № 6. – P. 655–660.

13. *Вастьянов Р.С.* Вираженість гострих генералізованих судом за умов блокади інтерлейкін-1-бета рецепторів / Р.С. Вастьянов, Ю.С. Стрельнікова // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2015. – № 25. – С. 76–81.

Р.С. Вастьянов, Ю.С. Стрельникова

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СУДОРОЖНОМ СИНДРОМЕ

Представлены данные экспериментальных исследований, показывающие влияние фактора некроза опухоли-α (ФНО) и интерлейкина-1β (ИЛ-1) на выраженность киндлинг-вызванного хронического судорожного синдрома. Обсуждается модулирующее влияние указанных цитокинов на развитие и прекращение судорог, а также на изменения концентрации ФНО и ИЛ-1 в крови и ткани мозга крыс в условиях киндлинговой модели эпилепсии. Показано развитие противосудорожного эффекта при пикротоксиновом киндлинге в условиях блокады активности интерлейкиновых рецепторов. Сделан вывод о патогенетическом значении системы цитокинов в эпилептогенезе, а также о патофизиологических механизмах хронического судорожного синдрома с точки зрения развития патологической дизрегуляционной интеграции нервной и иммунной систем.

Ключевые слова: *киндлинг, цитокины, фактор некроза опухоли, интерлейкин-1, рекомбинантный антагонист интерлейкин-1 рецепторов, дизрегуляционная патология.*

R.S. Vastyanov, Yu. S. Strelnikova

CYTOKINES PATHOGENETIC ROLE IN CONDITIONS OF CHRONIC CONVULSIVE SYNDROME

The data are given reflecting experimental trial results that revealed both tumor necrosis factor-α (TNF) and interleukin-1β (IL-1) influences on different forms of kindling-induced chronic seizure syndrome. Cytokines modulating influence on seizures development and termination is discussed together with cytokines-induced changes of TNF and IL-1 levels in blood plasma and brain of kindled rats. Anticonvulsive effects were shown in conditions of picrotoxin kindling as the result of IL-1 receptors block. Authors concluded about the cytokines pathogenetic importance in epileptogenesis as well as about the chronic convulsive syndrome pathophysiologic mechanisms accenting on neural and immune systems pathological dysregulative integration development.

Key words: *kindling, cytokines, tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-1 receptor recombinant antagonist, dysregulative pathology.*

Поступила 13.05.16