

## ВЛИЯНИЕ ДИПИРИДАМОЛА И АТФ НА ИММУНОСУПРЕССИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕОБСТРУКТИВНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

*А.И. Лазарев, Г.В. Сиплиный, Л.Е. Сипливая, А.В. Кукурека*

Курский государственный медицинский университет, г.Курск

**В исследованиях на 175 крысах породы «Вистар» показано, что тромбоциты животных с необструктивным пиелонефритом обладают иммуносупрессирующими свойствами, усиливающимися при взаимодействии с легкими эритроцитами и сывороточными факторами, накапливающимися в крови крыс с пиелонефритом. Введение дипиридамола и АТФ блокирует тромбоэритроцитарное звено развития иммуносупрессии у крыс с пиелонефритом. При этом действие дипиридамола направлено на агрегат тромбоцит-эритроцит, а действие АТФ на легкие эритроциты.**

**Ключевые слова:** дипиридамола, иммуносупрессия, эритроциты, тромбоциты, пиелонефрит, эксперимент.

Инфекционное поражение почек, являющееся одной из самых распространенных патологий, вызывает системные иммунометаболические нарушения, важнейшим компонентом которых является активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), изменение функционального состояния эритроцитов и тромбоцитов [1,4]. При пиелонефрите резко снижается электрокинетический потенциал эритроцитов, что является одной из причин их агрегации, активируются тромбоциты, что сопровождается образованием в них активных метаболитов кислорода, усиление ПОЛ. В связи с этим обоснованным является предположение о взаимосвязи между этими феноменами при пиелонефрите и возможности коррекции иммуносупрессирующей активности эритроцитов и тромбоцитов препаратами, повышающими энергообеспечение различных клеток, а также усиливающими иммунологическую реактивность и снижающие явление агрегации эритроцитов и тромбоцитов.

Изучено влияние АТФ, обладающей энергизирующей активностью, и дипиридамола, проявляющего иммуностимулирующий эффект и снижающий агрегацию эритроцитов и тромбоцитов [4].

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на 175 крысах линии Вистар массой 180-200 гр. Воспалительный процесс в почках крыс моделировали совместным введением арахидоновой кислоты и микробного агента *Staphylococcus aureus*. Арахидоновую кислоту вводили внутривентриально в дозе 2,5 мг/кг массы тела ежедневно 1 раз в сутки в течение 10 дней, на 10-е сутки эксперимента в яремную вену вводили 0,5 мл взвеси культуры *Staphylococcus* в количестве  $1 \cdot 10^8$  микробных тел [4]. Через 12 ч после введения микробного агента у животных в условиях наркоза из яремной вены выделяли кровь, эритроциты осаждали в колонке с фикол-гипак ( $1,083 \text{ г/см}^3$ ) и фракционировали в градиенте плотности яичного альбумина [8]. Получали легкую фракцию эритроцитов (плотность ниже  $1,079 \text{ г/см}^3$ ). Для получения и оценки иммуномодулирующей активности обогащенной и бедной тромбоцитами плазмы

кровь, полученную из хвостовой вены, смешивали с 3,8% раствором натрия цитрата в соотношении 9:1 и центрифугировали 5 мин при 180g. После расслоения крови на плазму, лейкоцитарный слой и эритроциты отбирали первые два слоя и центрифугировали в течение 10 мин при 600g. Супернатант представлял собой плазму, обогащенную тромбоцитами, концентрация тромбоцитов в которой составляла  $2 \cdot 10^8$  клеток в 1мл. Для получения плазмы дефицитной по тромбоцитам, плазму, обогащенную тромбоцитами, центрифугировали в течение 20 мин при 1000g [2]. Осадок представлял собой тромбоцитарную взвесь, содержащую до 96% тромбоцитов. Остальными клеточными элементами были лейкоциты (3%) и эритроциты (1%). Обогащенную и бедную тромбоцитами плазму использовали для обработки легких эритроцитов. Обработку эритроцитов проводили следующим образом:  $10^7$  клеток инкубировали в 1мл плазмы в течение 1ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . В отдельных исследованиях в плазме крови инкубировали смесь тромбоцитов ( $10^8$ ) и эритроцитов ( $10^7$ ) в 1 мл плазмы в течение 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Иммуномодулирующую активность инкубата определяли путем двукратного внутривенного введения с 12-часовым интервалом здоровым аллогенным иммунизированным животным. О выраженности ГИО судили по количеству антителообразующих клеток (АОК) и розеткообразующих клеток (РОК) в селезенке на 5-е сутки после иммунизации эритроцитами барана в дозе  $10^8$  клеток на 1 кг массы тела [5,7]. О выраженности ГЗТ судили по величине разницы массы (РМЛ) и количества кариоцитов (РКЛ) в регионарном и контрлатеральном лимфатических узлах, спустя 24ч после введения разрешающей дозы [9]. Дипиридамола и АТФ вводили внутривенно, пятикратно в дозах, соответственно, 3 мг/кг и 6 мг/кг.

Исследования на животных проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (г.Страсбург, Франция, 1986). Крыс выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом.

Результаты обрабатывали статистически. Вычисляли средние арифметические величины определявшихся показателей и их стандартные ошибки. Существенность различий средних величин оценивали по критериям Стьюдента [3] и Вилкоксона-Манна-Уитни [6].

### **Результаты и их обсуждение**

Инъекции тромбоцитов животных с пиелонефритом супрессировали ГИО и ГЗТ. Введение дипиридамола или АТФ не индуцировало появление иммуномодулирующих свойств у тромбоцитов здоровых крыс и снижало, но не отменяло полностью иммуносупрессирующую активность тромбоцитов крыс с пиелонефритом.

Установлено, что у крыс с пиелонефритом в крови появляются легкие эритроциты, проявляющие иммуносупрессирующую активность. Плазма интактных животных бедная или обогащенная тромбоцитами, а также плазма крыс с пиелонефритом, бедная тромбоцитами, не вызывает появления иммуносупрессирующих свойств у эритроцитов интактных крыс. В отличие от этого плазма крыс с пиелонефритом обогащенная тромбоцитами индуцировала появление иммуносупрессирующей активности у легкой фракции эритроцитов интактных крыс (табл. 1).

Таблица 1

### ***Влияние легких эритроцитов, инкубированных с плазмой и тромбоцитами интактных крыс и крыс с пиелонефритом, на развитие ГИО и ГЗТ у здоровых крыс***

Условия опыта	АОК	РОК	РМЛ	РКЛ
1. Контроль (без введения эритроцитов)	26,8±2,7	56,3±5,6	4,8±0,5	5,6±0,6
2. Введение нативных эритроцитов	25,6±2,5	57,1±6,1	4,5±0,4	5,9±0,5
3. Введение эритроцитов, инкубированных с ПИКБТ	27,1±2,9	59,3±5,2	5,1±0,4	5,4±0,5
4. Введение эритроцитов, инкубированных с ПИКОТ	26,3±2,6	55,9±5,4	4,6±0,5	6,1±0,7
5. Введение эритроцитов, инкубированных с ТИК	25,9±2,8	58,1±5,8	4,9±0,5	5,8±0,6
6. Введение эритроцитов, инкубированных с ПКПБТ	27,4±3,1	60,2±6,6	4,7±0,5	5,5±0,5
7. Введение эритроцитов, инкубированных с ПКПОТ	16,8±1,7 <sup>*1-6</sup>	30,2±3,1 <sup>*1-6</sup>	2,8±0,2 <sup>*1-6</sup>	2,9±0,3 <sup>*1-6</sup>
8. Введение эритроцитов, инкубированных с ТКП	10,4±1,2 <sup>*1-7</sup>	18,2±1,8 <sup>*1-7</sup>	2,2±0,3 <sup>*1-7</sup>	2,3±0,2 <sup>*1-7</sup>

*Примечание: \* - различия средних статистически значимы ( $p < 0,05$ ) по отношению к соответствующей группе;*

*ПИКБТ, ПИКОТ - соответственно плазма интактных крыс бедная и обогащенная тромбоцитами; ТИК, ТКП – соответственно тромбоциты интактных крыс и крыс с пиелонефритом; ПКПБТ, ПКПОТ – соответственно плазма крыс с пиелонефритом бедная и обогащенная тромбоцитами.*

Результаты этих исследований позволяют сделать вывод о том, что тромбоциты участвуют в развитии иммуносупрессии при пиелонефрите, и, что это действие тромбоцитов усиливается легкими эритроцитами и соединениями, накапливающимися в сосудистом русле животных при воспалительном процессе в почках. Показано, что в случае предварительной обработки сывороткой крыс с пиелонефритом тромбоцитов интактных крыс, их инкубат с эритроцитами интактных животных вызывал незначительный иммуносупрессирующий эффект. При обработке сывороткой крыс с пиелонефритом эритроцитов интактных крыс их инкубат с тромбоцитами интактных крыс значительно угнетал ГИО и ГЗТ. Результаты этих исследований показывают, что наиболее эффективно активация тромбоцитов происходит при связывании их с мембраной эритроцитов, включившей соединения сыворотки крыс с пиелонефритом.

Разделение эритроцитов и тромбоцитов с последующим переносом супернатанта, содержащего тромбоциты, и взвеси осадка эритроцитов показало, что в отличие от супернатанта с тромбоцитами, осадок вызывает выраженное угнетение ГИО и ГЗТ.

Таким образом, комплекс эритроциты и фиксированные на них тромбоциты генерируют более сильный иммуносупрессорный сигнал, чем тромбоциты, находящиеся в плазме.

Установлено, что введение дипиридамола отменяло появление иммуносупрессирующих свойств, как у легких эритроцитов, так и тромбоцитов. Инъекции АТФ не влияли на тромбоциты, но отменяли способность легких эритроцитов интактных

крыс приобретать иммуносупрессирующие свойства после инкубации с тромбоцитами и сывороткой крови крыс с пиелонефритом (табл. 2).

Таблица 2

***Влияние АТФ и дипиридамола на активность клеточных компонентов реализации иммуносупрессорного эффекта, вызываемого пиелонефритом***

Условия опыта	АОК	РОК	РМЛ	РКЛ
1. Контроль	25,2±2,4	55,4±5,4	4,8±0,4	5,9±0,5
2. Введение инкубата тромбоцитов интактных крыс, эритроцитов интактных крыс и сыворотки крыс с пиелонефритом				
	14,1±1,5 <sup>*1</sup>	30,8±3,0 <sup>*1</sup>	2,4±0,2 <sup>*1</sup>	3,4±0,3 <sup>*1</sup>
3. Введение инкубата эритроцитов интактных крыс и сыворотки крыс с пиелонефритом с тромбоцитами интактных крыс, получавших				
АТФ	23,8±2,2 <sup>*2</sup>	53,2±5,1 <sup>*2</sup>	4,4±0,5 <sup>*2</sup>	5,3±0,6 <sup>*2</sup>
Дипиридамола	24,1±2,4 <sup>*2</sup>	56,1±5,8 <sup>*2</sup>	4,9±0,6 <sup>*2</sup>	6,1±0,5 <sup>*2</sup>
4. Введение инкубата тромбоцитов интактных крыс и сыворотки крыс с пиелонефритом с эритроцитами интактных крыс, получавших				
АТФ	15,7±1,8	28,2±2,4	2,8±0,3	3,2±0,4
Дипиридамола	25,2±2,4 <sup>*2</sup>	54,8±5,4 <sup>*2</sup>	4,6±0,4 <sup>*2</sup>	5,7±0,5 <sup>*2</sup>

Результаты проведенных исследований подтверждают предположение о том, что изученные препараты действуют на различные звенья механизма развития иммуносупрессии. По-видимому, введение дипиридамола снижает агрегационную и адсорбционную способность эритроцитов и тромбоцитов, тем самым предотвращает образование агрегатов тромбоцит-эритроцит, необходимых для сильного иммуносупрессорного сигнала, и предупреждает повышение содержания на их мембранах холестерина и продуктов гидролиза фосфолипидов, приводящих к увеличению активности тромбоцитов.

Действие АТФ обусловлено увеличением энергообеспечения эритроцитов и изменением эпителиальных структур их мембраны, следствием чего является снижение способности клеток взаимодействовать с субстанциями сыворотки и тромбоцитами.

#### **Выводы**

1. В крови животных с необструктивным пиелонефритом появляются тромбоциты, легкие эритроциты и гуморальные сывороточные факторы, обладающие иммуносупрессирующей активностью.

2. Иммуносупрессирующие свойства тромбоцитов усиливаются при взаимодействии с мембраной эритроцитов, включившей соединения сыворотки, накапливающиеся в крови крыс с необструктивным пиелонефритом.

3. Введение дипиридамола отменяло появление иммуносупрессирующих свойств, как у легких эритроцитов, так и у тромбоцитов.

4. Введение АТФ отменяло способность легких эритроцитов приобретать иммуносупрессирующие свойства после инкубации с тромбоцитами и сывороткой крыс с пиелонефритом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев В.А. О механизме развития иммуносупрессии при острой почечной недостаточности / В.А. Афанасьев, И.Л. Ласкова // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1997. - №3. – с.31 – 35
2. Влияние тромбоцитов на генерацию активных форм кислорода лейкоцитами / А.Х. Коган и др.// Бюл. экспер. биол. и мед. – 1992. – Т. 113, №6. – с.528 – 584
3. Гумблер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико – биологических исследованиях / Е.В. Гумблер, А.И. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – 141с.
4. Есилевский Ю.М. Патогенез пиелонефрита/ Ю.М. Есилевский – М.: МЕД-пресс–информ, 2007 – 362с.
5. Зауэр Х. Метод иммунных розеток/ Х. Зауэр// Иммунологические методы; Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем.-М.: Мир,1987.- С.273-282.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 293с.
7. Мальберг К. Метод локального гемолиза/ К. Мальберг, Э. Зигль// Иммунологические методы; Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – С.57 – 72.
8. Методика разделения эритроцитов на возможные группы / Т.В. Кобзев и др. // Патол. системы крови и кровообращения: Сб. ст. – Симферополь, 1978. – с.49 – 51.
9. Руководство по иммунологическим и аллергологическим методам в клинических исследованиях / Т.В. Федосеева и др. – М., 1993. – 319с.

**INFLUENCE OF DIPYRIDAMOLE AND ATP ON IMMUNOSUPPRESSING PROPERTIES OF ERYTHROCYTES AND THROMBOCYTES IN EXPERIMENTAL NON - OBSTRUCTIVE PYELONEPHRITIS**

*G.V. Siplivyi, A.I. Lazarev, L.E. Siplivaya, A.V. Kukureka*

**Investigations on 175 Wistar rats showed that thrombocytes of animals with non-obstructive pyelonephritis have possessed immunosuppressing properties being increased on interaction with light erythrocytes and serum factors, accumulated in blood of rats with pyelonephritis. Introduction of dipyridamole and ATP blocked thromboerythrocyte chain of immunosuppression development in rats with pyelonephritis. Here, the pyridamole action was directed to thrombocyte – erythrocyte unit, and the ATP action – to light erythrocytes.**

*Keywords: dipiradamol, immunosuppression, red cells, platelets, pyelonephritis, experiment.*

Лазарев Алексей Иванович – профессор кафедры оториноларингологии, доктор медицинских наук, профессор ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет

Сипливый Геннадий Вячеславович – доцент кафедры урологии ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, кандидат медицинских наук, доцент.

Сипливая Любовь Евгеньевна – заведующая кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, доктор биологических наук, профессор. [farmchim@rambler.ru](mailto:farmchim@rambler.ru)

Кукурека Александр Владимирович – старший преподаватель кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ГОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, кандидат фармацевтических наук. [farmchim@rambler.ru](mailto:farmchim@rambler.ru)

Ключевые слова к статье Сиплиной:

**Keywords:** *dipiradamol, immunosuppression, red cells, platelets, pyelonephritis, experiment.*

Ключевые слова к статье Губанова:

**Key words:** *diclofenac sodium, surface-active substances, gel, ointment*

Ключевые слова к статье Куповой :

**Keywords:** *medical vocabulary, translation, tracing.*

Ключевые слова и сведения об авторах статьи Маркова:

**Keywords:** *national project, prevention, healthy lifestyles.*

Марков В.В. – врач-ординатор МУЗ «Городская больница №3 г. Пензы», [konovalov\\_oe@mail.ru](mailto:konovalov_oe@mail.ru)  
Шомиров С. С. врач-уролог №183 Городская поликлиника г. Москвы.