

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *BERGENIA CRASSIFOLIA* НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В УСЛОВИЯХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

А. А. Чуринов, Н. В. Масная, Е. Ю. Шерстобоев, Н. И. Суслон¹

Изучено влияние экстракта из бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* Fritsch) на специфический иммунный ответ в условиях иммунодепрессивных состояний, вызванных иммобилизационным стрессом или введением циклофосфана. Показано нормализующее действие препарата на содержание антителообразующих клеток в селезенке экспериментальных мышей в условиях стимуляции гуморального иммунитета антигеном и на обеих моделях иммунодепрессии. Экстракт бадана снижает выраженность воспалительных процессов в условиях реакции гиперчувствительности замедленного типа, препятствуя накоплению Т-лимфоцитов в очаге воспаления и снижая способность этих клеток продуцировать провоспалительные цитокины.

Ключевые слова: бадан толстолистный, первичный гуморальный иммунный ответ, иммобилизационный стресс, циклофосфан, иммунодепрессия

ВВЕДЕНИЕ

Ранее были изучены психофармакологические свойства сухого экстракта бадана толстолистного (ЭБТ). Показаны выраженные адаптогенные и ноотропные свойства препарата в условиях высоких психоэмоциональных нагрузок в конфликтной ситуации и при выработке питьевого рефлекса [2, 8]. Экстракт бадана нормализует показатели электроэнцефалограммы головного мозга экспериментальных животных при нарушениях высшей нервной деятельности [8], оказывает положительное влияние на энергетические и пластические процессы в организме, обладает антирадикальной активностью [7]. Вместе с тем данные о влиянии бадана толстолистного на специфический иммунный ответ носят противоречивый характер [3, 10]. В связи с этим нами проведены исследования реакции иммунной системы после курсового введения растительного препарата в условиях функциональных нагрузок для выявления его иммунотропной активности.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния экстракта *Bergenia crassifolia* на показатели первичного гуморального и клеточного иммунного ответа в условиях экстремальных воздействий различного генеза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 120 мышах линий DBA/2 1 категории (конвенциональные линейные мыши) в возрасте 3 мес массой 18 – 20 г. Животные получены из коллекционного фонда НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертификат имеется).

¹ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 634028, пр. Ленина, 3.

Функциональную активность иммунной системы оценивали по количеству антителообразующих клеток в селезенке и титру Ig-антител в сыворотке крови после введения тимусзависимого антигена (ТЗА): животных иммунизировали однократно внутрибрюшинно по 0,2 мл 15 % взвеси эритроцитов барана ($6 \cdot 10^8$ на мышь).

Мышам экспериментальных групп вводили циклофосфан (производства Саранского комбината “Биохимик”) однократно внутрибрюшинно в дозе 250 мг/кг. Доза циклофосфана была определена методом графического пробит-анализа [1] для мышей линии СВА/Са Лас (стандартная биологическая модель) и являлась максимально переносимой. Однократное введение этого препарата приводит к изменениям в кроветворной и иммунной системах, которые можно характеризовать как иммунодефицитное состояние [5]. Для исследования влияния противоопухолевого препарата на функциональную активность иммунной системы животных иммунизировали ТЗА на 4-е сутки после однократного введения циклофосфана.

Экспериментальную модель иммобилизационного стресса создавали в полых замкнутых цилиндрах с ограничением подвижности животных в течение 16 ч. Иммунизацию животных антигеном проводили на 4-е сутки после иммобилизационного стресса. В качестве интактного контроля (фон) использовали здоровых животных линии DBA/2.

Экстракт бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* Fritsch.) получен в Государственном центре лекарственных средств (ГНЦЛС) Харьков. В химическом отношении состав экстракта включал: полифенолов — 48 %, дубильных веществ — 32 %, арбутин — 19 %,

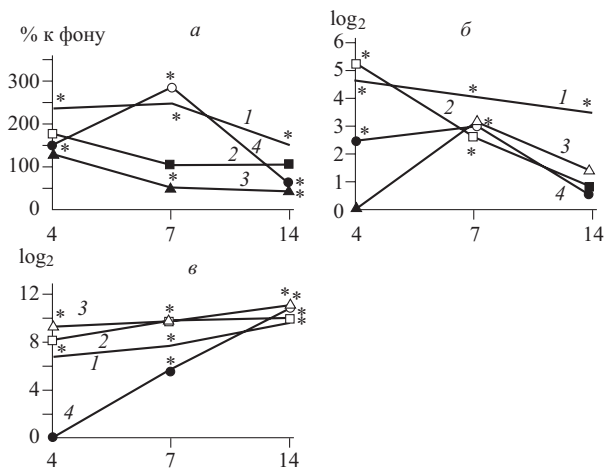


Рис. 1. Динамика содержания антителообразующих клеток (а) в селезенке, выраженная в процентах от фоновых значений, титра IgM- (б), IgG-антител (в) у иммунизированных мышей (1), у иммунизированных после введения экстракта бадана толстолистного (2), иммунизированных животных после иммобилизационного стресса (3), иммунизированных после иммобилизационного стресса мышей на фоне введения экстракта бадана толстолистного (4).

Здесь и на рис. 2: * — $p < 0,05$ по сравнению с фоновой группой животных; закрашенный маркер — $p < 0,05$ по сравнению с иммунизированной группой животных. По оси абсцисс — срок наблюдения, сут; по оси ординат — (а) проценты от соответствующих показателей фоновой группы; (б, в) титр антител в \log_2

бергерина — 0,026 %. Стандартизация экстракта осуществлялась по содержанию арбутина (не менее 18 %).

Непосредственно перед использованием препарат растворяли в дистиллированной воде и вводили животным через зонд в желудок курсами, начиная со дня экспериментального воздействия (введение противоопухолевого препарата или иммобилизационный стресс), и далее в течение 5 дней в дозе 50 мг/кг в объеме 0,2 мл растворителя. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя.

Мышей декапитировали на 4-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки после иммунизации. Сравнение данных, полученных при изучении иммунной системы животных, проводили с соответствующими значениями у здоровых мышей (интактный контроль), а также у животных, получивших только антиген (контрольная группа). В группах мышей, получивших экстракт бадана толстолистного, исследуемые показатели сравнивали со значениями контрольных групп и мышей, иммунизированных на 4-е сутки после введения циклофосфана или проведения иммобилизационного стресса.

Фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (ФАПМ) определяли методом измерения оптической плотности лизирующего раствора после разрушения фагоцитов, поглотивших частицы нейтрального красного [12]. Абсолютное (10^6 на орган) количество антителообразующих клеток в селезенке определяли методом локального гемолиза [11]; уровень специфических антител в сыворотке крови — в реакции гемагглютинации [4]. Оценку влияния препарата на клеточ-

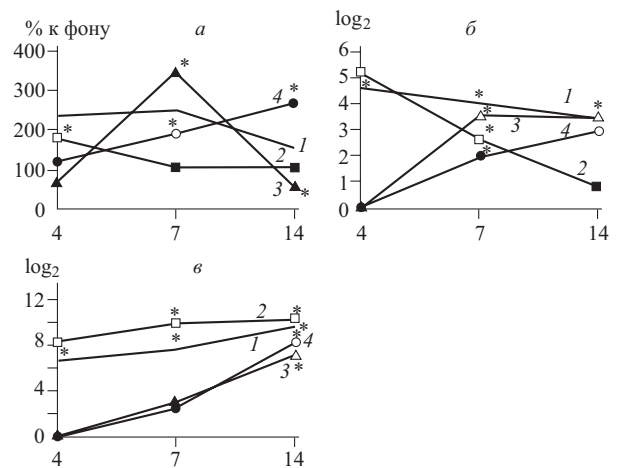


Рис. 2. Динамика содержания антителообразующих клеток (а) в селезенке, выраженная в процентах от фоновых значений, титра IgM- (б), IgG-антител (в) у иммунизированных мышей (1), иммунизированных после введения экстракта бадана толстолистного (2), иммунизированных животных после введения циклофосфана (3), иммунизированных после применения циклофосфана мышей на фоне введения экстракта бадана толстолистного (4).

Обозначения те же, что на рис. 1.

ный иммунный ответ проводили в реакции гиперчувствительности замедленного типа [9]. При постановке реакции антиген животным вводили двукратно: для сенсibilизации и для разрешения. Для сенсibilизации мышам вводили подкожно $1 \cdot 10^7$ эритроцитов барана в объеме 100 мкл. Разрешающую дозу антигена ($1 \cdot 10^8$ эритроцитов барана в объеме 20 мкл) вводили на 5-й день после сенсibilизации под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей. В контралатеральную лапу в качестве контроля вводили физиологический раствор в таком же объеме. Экстракт бадана толстолистного вводили мышам до сенсibilизации (I схема), либо до введения разрешающей дозы антигена (II схема). Учет интенсивности воспалительной реакции осуществляли через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена. Для этого мышам забивали, отсекали обе лапы на уровне голеностопного сустава и взвешивали на торсионных весах. Индекс воспаления определяли по разнице массы опытной и контрольной лап.

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали методом вариационной статистики, используя пакет статистических программ "STATISTICA for Windows".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании влияния ЭБТ на первичный гуморальный ответ показано, что препарат снижает абсолютное количество антителообразующих клеток в селезенке экспериментальных мышей после иммунизации ТЗА на 7-е и 14-е сутки в сравнении с только иммунизированной группой (рис. 1, а). Коррекция эк-

страктом бадана иммунодепрессивного состояния, вызванного однократным иммобилизационным воздействием, привела к возрастанию на 7-е сутки изучаемого показателя выше соответствующих значений в фоновой и контрольной группах, с последующим его значимым снижением на 14-е сутки (рис. 1, а). В группе животных, иммунизированных после введения циклофосфана, ЭБТ вызвал нарастание абсолютного количества антителообразующих клеток относительно фоновых значений на 7-е сутки и соответствующих значений в фоновой и контрольной группах на 14-е сутки наблюдения (рис. 2, а).

При иммунизации мышей ТЗА на 4-е сутки наблюдалось возрастание титра IgM-антител в сыворотке крови контрольных животных, сохранившееся высоким на всем протяжении исследования (рис. 1, б). Максимальный титр IgG-антител в сыворотке крови этой группы животных наблюдался к 14-м суткам эксперимента (рис. 1, в). Применение ЭБТ не привело к значимым изменениям в динамике накопления IgM- и IgG-антител в сыворотке иммунизированных животных (рис. 1, б, в). В группе животных, иммунизированных после иммобилизационного стресса, применение ЭБТ привело к значимому нарастанию титра IgM-антител уже на 4-е сутки, тогда как в группе мышшей, иммунизированных после иммобилизационного стресса, это происходило на 7-е сутки эксперимента (рис. 1, б). В то же время динамика накопления IgG-антител в исследуемой группе соответствовала таковой в группе сравнения, но на 4-е и 7-е сутки наблюдения уровень титра был достоверно ниже значений у животных, иммунизированных на фоне перенесенного стресса (рис. 1, в). Применение ЭБТ на фоне однократного введения циклофосфана в группе иммунизированных животных способствовало повышению показателя титра IgM-антител в сыворотке животных до уровня значений контрольной группы на 14-е сутки наблюдения (рис. 2, б). Максимальный уровень IgG-антител в сыворотке крови животных исследуемой группы наблюдался на 14-е сутки эксперимента (рис. 2, в). Таким образом, у животных иммунизированных после введения ЭБТ на фоне цитостатической иммунодепрессии, как и в группе не получавшей препарат, наблюдалось смещение пика синтеза IgM-антител на 14-е и 7-е сутки соответственно, в отличие от контрольной группы иммунизированных животных, где максимум накопления IgM-антител наблюдался на 4-е сутки эксперимента.

Уровень ФАПМ в группах, перенесших иммобилизационный стресс либо введение циклофосфана, как на фоне применения ЭБТ, так и без него был достоверно ниже соответствующих фоновых значений. В группе животных, получавших ЭБТ, применение препарата не оказало существенного влияния на фагоцитарную активность макрофагов на всем протяжении эксперимента.

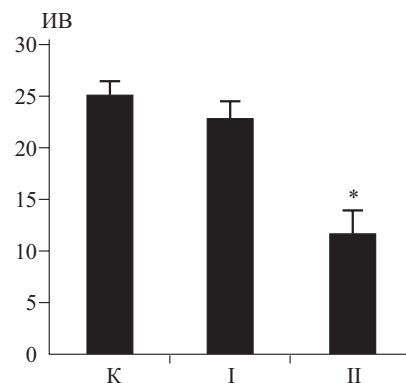


Рис. 3. Индекс воспаления (ИВ) в реакции гиперчувствительности замедленного типа в контрольной группе (К), в группе с ведением экстракта бадана с сенсibilизирующей дозой антигена (I), в группе с ведением экстракта бадана с разрешающей дозой антигена (II).

* — $p < 0,002$ по сравнению с контрольной группой животных. По оси абсцисс — группы наблюдения; по оси ординат — индекс воспаления.

Для оценки влияния ЭБТ на процесс образования клона антиген-специфических Т-лимфоцитов в реакции ГЗТ препарат вводили до сенсibilизации мышшей эритроцитами барана. При этом не было выявлено существенного влияния препарата на накопление Т-лимфоцитов в очаге воспаления (рис. 3). Введение экстракта бадана по второй схеме значительно снизило способность этих лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные цитокины (рис. 3).

Обсуждая механизмы действия ЭБТ на систему иммунитета в моделях иммобилизационного стресса и циклофосфановой иммунодепрессии можно предположить, что наибольший вклад в иммуностропное действие препарата вносят его ноотропные свойства, показанные ранее [2, 8]. Известно, что экстремальные воздействия приводят к стимуляции перекисного окисления липидов и нарушению липидного бислоя мембран клеток [6]. В основе механизма цитостатического действия циклофосфана важная роль отводится альтерации структуры митохондрий, приводящей к нарушению энергетики клетки, в частности, окислительного фосфорилирования и дыхания [1]. В то же время показано, что действие экстракта бадана направлено на усиление естественных компенсаторных реакций системы энергопродукции и связано с нормализацией активности глутаматзависимой системы переаминирования, процессов перекисного окисления липидов [7]. Введение экстракта бадана толстолистного в условиях развития иммунодепрессии, вызванной стрессом или циклофосфаном, ускоряет восстановление реакций гуморального звена иммунного ответа, вероятно, за счет нормализации функционирования системы энергопродукции иммунокомпетентных клеток, стабилизации их мембран и, как следствие, рецепторного аппарата.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт бадана толстолистного оказывает модулирующее влияние на первичный гуморальный ответ, в частности, на абсолютное количество антителообразующих клеток. Препарат снижает количество антителопродуцентов при стимуляции их антигеном и повышает их количество в условиях иммунодепрессивных состояний, вызванных воздействием стресса либо циклофосфана.

2. Препарат из бадана толстолистного не оказывает существенного влияния на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов иммунизированных животных и снижает ее уровень в группах, перенесших иммобилизационный стресс или введение циклофосфана.

3. Введение экстракта бадана ограничивает развитие процессов воспаления в реакции гиперчувствительности замедленного типа, снижая способность Т-лимфоцитов синтезировать провоспалительные цитокины в очаге воспаления при встрече с антигеном.

ЛИТЕРАТУРА

1. З. П. Булкина, *Противоопухолевые препараты*, 2-е изд., Научова думка, Киев (1991).

2. С. А. Емельянов, Н. И. Суслов, В. Г. Пашинский, *Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов*, т. 5, Томск (1992), сс. 101 – 103.
3. С. Д. Жамсаранова, З. Д. Булытова, Е. М. Бужинаева, *Сохранение биологического разнообразия в Байкальском регионе: проблемы, подходы, практика*, т. 2, Улан-Удэ (1996), сс. 121 – 122.
4. Н. Р. Линг, Д. Кэтти, *Гемагглютинация и реакции антителозависимого гемолиза. Антитела. Методы*, кн.1. Мир, Москва (1991).
5. Н. В. Масная, Г. М. Ратнер, *Бюл. exper. биол.*, **129**(4), 440 – 443 (2000).
6. Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенников, *Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам*, Медицина, Москва (1988).
7. Н. Б. Смирнова, В. А. Хазанов, *Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов*, т. 10, Томск (1999), сс. 176 – 178.
8. Н. И. Суслов, А. А. Чурин, Е. Г. Скурихин и др., *Exper. и клин. фармакол.*, **65**(1), 7 – 10 (2002).
9. Р. М. Хайтов, И. С. Гушин, Б. В. Пинегин и др., *Ведомости Фармакологического Комитета*, № 1, 31 – 36 (1999).
10. Bai San, Bai Asiya, and Liu Fa, *5th China-Jap. Jt Meet. Pharmacol. Hangzhou*, Oct. 28 – 31, № 1, (1995), 88.
11. A. J. Cunningham, *Nature*, **207**, 1106 – 1107 (1965).
12. B. Vrav, J. Hoebeke, M. Saint – Guillaïn et al., *Scand. J. Immunol.*, **11**, 147 – 153 (1980).

Поступила 18.03.04

EFFECT OF *Bergenia crassifolia* EXTRACT ON SPECIFIC IMMUNE RESPONSE PARAMETERS UNDER EXTREMAL CONDITIONS

A. A. Churin, N. V. Masnaya, E. Yu. Sherstoboev, and N. I. Suslov

Laboratory of Pathophysiology and Experimental Therapy, Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028 Russia

The influence of a dry extract from *Bergenia crassifolia* (Fritsch) on the specific immune response parameters was studied under extremal conditions of model immunodepressive states induced by immobilization stress or cyclophosphamide injections. The drug produced normalizing effect on the content of antibody-forming cells in the spleen of experimental mice under the conditions of humoral response stimulation by antigen and in both immunodepression models. The bergenia extract decreases expression of inflammatory processes under delayed hypersensitivity reaction conditions, by preventing the accumulation of T-lymphocytes in the inflammation focus and reducing the ability of cells to produce anti-inflammatory cytokines.