

УДК 615.2

## ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА «ВИТАНАМ»

В.С. Орлова<sup>1\*</sup>, Е.В. Орлова<sup>2</sup>, А.С. Тимохина<sup>1</sup>, Я.М. Станишевский<sup>1</sup>

**Резюме.** В работе показано влияние нового препарата «Витанам» – селективного активатора Ca-зависимой NO-синтазы на процессы T- и B-клеточного иммунитета у лабораторных животных. «Витанам» является иммуномодулятором широкого спектра действия, причем эффект препарата проявляется и при его пероральном введении.

**Ключевые слова:** T- и B-клеточный иммунитет, Ca-зависимая NO-синтаза, «Витанам».

### THE STUDY OF IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF THE VITANAM

V.S. Orlova<sup>1\*</sup>, E.V. Orlova<sup>2</sup>, A.S. Timokhina<sup>1</sup>, Ya.M. Stanishevskiy<sup>1</sup>

**Abstract.** In the present paper some immunological effects on T- and B-cell immunity of a new drug Vitanam – selective activator of Ca-dependent NO-synthase were shown on the animal model.

**Keywords:** T- and B-cell immunity, Ca-dependent NO-synthase, Vitanam.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 115093, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), 142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – Institute of Theoretical and Experimental Biophysics (ITEB) RAS, 3, Institutsкая str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

\* адресат для переписки:

E-mail: eaglson@mail.ru

Тел.: 8 (499) 936 85 99

## ВВЕДЕНИЕ

В течение последних двух десятилетий оксид азота (NO) был признан одним из самых универсальных игроков в иммунной системе. Ca<sup>2+</sup>-зависимая NO-синтаза (NOS) участвует в патогенезе и борьбе с инфекционными заболеваниями, опухолями, аутоиммунными процессами и хроническими дегенеративными заболеваниями. Рядом исследователей было показано, что Ca<sup>2+</sup>-зависимой NOS принадлежит важная роль в регуляции многих иммунных процессов в организме человека и животных [1–2]. Препарат «Витанам» является селективным активатором Ca<sup>2+</sup>-зависимой NOS. В связи с этим представляло большой интерес изучение влияния полученного препарата на отдельные звенья системы иммунитета, в частности на системы T- и B-лимфоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Изучение влияния нуклеотидного препарата на систему иммунитета* проведено по стандартам и руководствам GLP на мышах линий CBA, BALB/c, C<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub> (самцы и самки, масса тела 16–18 г) и крысах, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА и лимфоцитах донорской крови человека.

Мышей содержали в клетках T<sub>3</sub>, крыс – в клетках T<sub>4</sub> по 6–10 особей в клетке при температуре 22±3 °C и относительной влажности 60±10%. Освещение искусственное, продолжительность светлого и темного периодов 12 ч. В помещении поддерживался 12-кратный воздухообмен, животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму и к питьевой воде. Все животные получали стандартный комбикорм К-122, изготовленный НПО «Сельскохозяйственные технологии», состав, пищевая ценность, содержание витаминов и микроэлементов которого указаны в таблице 1.

Комбикорм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам, витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов.

Содержание витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма в мг: А – 7,00 тыс. МЕ, В12 – 0,02, В2 – 3,00, В3 – 20,00, В4 – 292,00, В5 – 20,00, В6 – 4,00, Е – 5,00, Н – 0,10, К3 – 1,00, Cu – 2,5, Fe – 10, J – 0,7, Mn – 70, Zn – 70. (сертификат соответствия № РОСС RU. П081. ВОО113 ГОСТ 50258-92)

Для проведения экспериментов *in vitro* использовали следующие питательные среды: среда А – для отмывания клеток – 199 или «Игла» с добавлением 10% инактивированной (560 °C, 30 мин) фетальной оленьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина.

Таблица 1.

Состав и показатели качества гранулированного корма К-122 для мелких лабораторных животных

В состав корма входят	%	Показатели качества	%
Овес	5	Сырой протеин	17,3
Кукуруза, ячмень	12,1		
Пшеница	14,2		
Шрот подсолнечниковый	7,6	Обменная энергия	247,0 ккал
Отруби пшеничные	15	Сырая клетчатка	9,95
Дрожжи кормовые	2,9	Сырой жир	2,78
Травяная мука 1 класса	27	Са	0,75
Соль поваренная	0,3	Р	0,51
Премикс минерально-витаминный	1	Натрий хлористый	0,54
Мука рыбная	2,8	Лизин	0,75
Мел кормовой	1,6	Мет. + Цист.	0,54

Среда Б для культивирования лимфоцитов в функциональных тестах – среда RPMI-1640, содержащая 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамин,  $5 \times 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанол и 50 мкг/мл гентамицина.

Среда В для культивирования клеток К 562 (клетки-мишени для естественных киллеров) *in vitro* – среда RPMI-1640, содержащая 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамин и 50 мкг/мл гентамицина.

Для работы с клетками лимфоидных органов *in vitro* животных забивали цервикальной дислокацией, асептически выделяли селезенку или тимус, клетки получали продавливанием через двойную нейлоновую сетку в среде А с последующим отстаиванием в течение 3–5 мин при 4 °С и 3-кратным отмыванием и центрифугированием в среде А. После чего клетки ресуспендировали в среде Б и доводили до необходимых конечных разведений.

При изучении влияния нуклеотидного препарата на **В-клеточное звено иммунитета** определяли титры агглютининов к эритроцитам барана в сыворотке крови мышей в тесте прямой гемагглютинации по методу Г.П. Кудриной с соавт. [3], количество антителообразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных эритроцитами барана, определяли по методу Эрне [4], влияние препарата на реакцию бласттрансформации В-лимфоцитов в ответ на стимуляцию липополисахаридом исследовали по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5].

Исследование влияния нуклеотидного препарата на титр агглютининов к эритроцитам барана в сы-

воротке крови в **тесте прямой гемагглютинации** выполнено на двух оппозитно реагирующих на эритроциты барана линиях мышей C<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> (низкоотвечающие) и СВА (высокоотвечающие). Мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением суспензии эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе  $3 \times 10^7$  клеток. Подопытным животным одновременно с иммунизацией однократно внутрибрюшинно или 3-кратно в желудок в последующие дни вводили нуклеотидный препарат в дозах 5 и 10 мг/кг.

На 7-е сутки после иммунизации получали сыворотку крови мышей, которую после инактивации комплемента прогреванием при 56 °С в течение 30 мин использовали для определения титра агглютининов (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчетливая агглютинация ЭБ). Определение титра гемагглютининов проводили в лунках микропланшетов для иммунологических реакций методом последующих разведений перед добавлением ЭБ и последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Титры агглютининов к ЭБ выражали величиной  $\log_2 T$ , где Т – титр антител исследуемой сыворотки [3].

Для определения влияния нуклеотидного препарата на **количество антителообразующих клеток** в селезенке мышей СВА и C<sub>57</sub>BL<sub>6</sub>, иммунизированных ЭБ, использовали прямой метод локального гемолиза в агаровом геле по методу Эрне [4]. Мышей иммунизировали внутривенным введением ЭБ, отмывтых в старильном физиологическом растворе в субоптимальной иммуногенной дозе  $3 \times 10^7$  клеток/мышь. Мышам однократно в день иммунизации внутрибрюшинно или 3-кратно в желудок в последующие дни вводили нуклеотидный препарат в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно. На 4-е сутки после иммунизации определяли число АОК в селезенке по методу Эрне. Для этого суспензию клеток селезенки мышей отмывали средой А и смешивали с ЭБ в расплавленном и охлажденном до температуры 40 °С агаре в следующей пропорции:  $1 \times 10^6$  клеток в 200 мкл среды Б и 0,15 мл 25% суспензии отмывтых ЭБ добавляли к 4 мл 0,75% агара, растворенного на среде Б. Полученную смесь немедленно разливали по чашкам Петри, на которые предварительно наносили равномерный слой 1,5% агара на среде Б. Чашки Петри помещали на 2 ч в термостат при 370 °С. В качестве источника комплемента использовали лиофилизированную сыворотку морских свинок, которую разводили физиологическим раствором (1:5) и добавляли еще на 40 мин. По завершении инкубации подсчитывали число гемолитических бляшек. Число АОК пересчитывали на 1 селезенку и на  $1 \times 10^6$  спленоцитов.

Изучение влияния нуклеотидного препарата на **бласттрансформацию В-лимфоцитов селезенки**, индуцируемую липополисахаридом (LPS), проводили по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5] на мышах линии

СВА, которым внутрибрюшинно вводили исследуемый препарат в дозах 10 и 100 мкг/кг. Клетки выделяли аналогично методу при определении АОК. В ячейки круглодонных 96-луночных микропанелей вносили по 100 мкл суспензии клеток селезенки мышей СВА в концентрации  $2 \times 10^6$ /мл и 100 мкл LPS («Дифко», США) в концентрациях 1,0; 5,0; 10 и 20 мкг/мл. Каждую концентрацию митогена и препарата исследовали в трех параллельных опытах. Инкубацию проводили 72 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. За 18 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 1 мкКи <sup>3</sup>H-тимидина (Amersham, США) (уд. акт. 24 Ки/мМ) в объеме 10 мкл. По окончании инкубации клетки собирали на стекловолоконные фильтры с помощью 12-канального харвестера, отмывали 0,15 М NaCl, 5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 96% этанолом. Высушенные фильтры помещали во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости (5 г 2,5-дифенил-оксазола на 100 мг 1,4-бис(2,5-фенил-оксазолил)бензола на 1 л сцинтилляционного толуола). Образцы просчитывали на сцинтилляционном β-счетчике [Tri-Carb B2810TR (Perkin Elmer, США)]. Результаты выражали в имп/мин.

Для оценки влияния нуклеотидного препарата на **Т-клеточное звено** иммунитета использовали реакцию **гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)** по методу Е.Ю. Гусева и соавт. [6] и метод поликлональной активации Т-лимфоцитов фитогемагглютинином и конканавалином А по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5]. Исследования выполнены на мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20 г), которых иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе  $1 \times 10^7$  клеток/мышь. Мышам подопытных групп в день иммунизации внутрибрюшинно вводили 5 и 10 мг препарата в 25 мкл стерильного изотонического раствора NaCl. Контрольные животные в этот же срок получали соответствующие количества физиологического раствора.

Для проявления реакции ГЗТ на 7-е сутки животным субплантарно в левую заднюю лапу вводили разрешающую инъекцию ЭБ в дозе  $1 \times 10^8$  клеток/мышь. В контрлатеральную лапу вводили изотонический раствор NaCl в объеме 50 мкл. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч по разнице массы опытной (Р<sub>о</sub>) и контрольной (Р<sub>к</sub>) лап.

При исследовании влияния нуклеотидного препарата на **поликлональную активацию Т-лимфоцитов, индуцированную фитогемагглютинином (ФГА) и конканавалином А (Кона)**, использовали суспензию клеток селезенки мышей СВА. Нуклеотидный препарат в изучаемых дозах вводили мышам внутрибрюшинно 3 раза через каждые 2 дня. Контрольной группе животных вводили среду 199 при тех же условиях в объемах, соответствующих объемам вводимого препарата. На 8-е сутки после последнего введения нуклеотидного препарата мышам забивали

и извлекали селезенку, которую гомогенизировали в среде А. Клетки центрифугировали 5 мин при 200 г 3 раза. К осадку клеток добавляли 2 мл среды В. В качестве митогенов использовали ФГА и Кона в концентрациях 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10 и 20 мкг/мл и ФГА-Р («Серва», ФРГ) – 0,1; 1,0; 10 и 50 мкг/мл. Реакцию проводили в 96-луночных круглодонных планшетах. Культивирование проводили в объеме 200 мкл (100 мкл ФГА и Кона + 100 мкл взвеси клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>) в течение 72 ч. В контроле ставили реакцию на спонтанную пролиферацию клеток селезенки без митогена. Пролиферацию и бласттрансформацию Т-лимфоцитов оценивали по количеству меченого <sup>3</sup>H-тимидина (Amersham, США), включенного в ДНК лимфоцитов. Результаты выражали в имп/мин.

Изучение влияния нуклеотидного препарата на **продукцию ИЛ-2 клетками селезенки мышей BALB/c, стимулированными Кона**. По 1 мл суспензии спленоцитов мышей в среде Б ( $5 \times 10^6$  клеток/мл), 5 мкг/мл Кона и препарата в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл вносили в ячейки 24-луночных панелей и инкубировали 24 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации отбирали надосадки, которые хранили при –20 °С. В качестве индикаторных клеток для тестирования активности ИЛ-2 использовали 96-часовые Т-клеточные бласты мышей BALB/c, активированные в тех же условиях, при которых получали ИЛ-2. Клетки до тестирования дважды отмывали средой А с α-метил-Д-маннозидом (20 мг/мл) и переводили в свежую среду Б. Готовили двойные разведения ИЛ-2 в плоскодонных 96-луночных панелях в объеме 100 мкл. Затем в лунки добавляли равный объем суспензии Т-бластов ( $0,65 \times 10^6$ /мл). Через 14 ч инкубации в лунки вносили <sup>3</sup>H-тимидин в объеме 10 мкл. Затем через 4 ч инкубации клетки осаждали на стекловолоконные фильтры, отмывали физраствором, преципитировали 5% ТХУ и обрабатывали 96-метанолом. Радиоактивность проб определяли на β-счетчике, результаты выражали в условных единицах активности ИЛ-2 [7].

Оценку влияния нуклеотидного препарата на **продукцию ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными ФГА**, проводили по методу М. Lyte [8]. 100 мкл гепаринизированной венозной донорской крови вносили в ячейки 24-луночных панелей и добавляли 90 мкл среды Б, содержащей 20 мкг ФГА и нуклеотидный препарат в конечных концентрациях 10, 50 или 100 мкг/мл. Клетки инкубировали 48 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации отбирали надосадки и хранили при –20 °С. Последующее тестирование активности ИЛ-2 проводили на Т-блестах мышей BALB/c в соответствии с описанными выше методическими приемами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Исследование влияния комплексного препарата «Витанам» на В-клеточное звено иммунитета

Лекарственные препараты или химические вещества, обладающие иммуномодулирующей активностью, могут оказывать прямое действие на В-лимфоциты, амплифицируя антигенный сигнал или повышая чувствительность рецепторов к воздействию регуляторных клеток. Иммуномодулирующее действие может проявляться также опосредованно через воздействие препаратов на регуляторные клетки. Интактный В-лимфоцит через антигенспецифический рецепторный комплекс распознает антиген, процессирует его, представляет Т-хелперу типа 2 (Т-зависимый ответ) и в результате информационного межклеточного обмена через продукцию и рецепцию растворимых и мембраноассоциированных медиаторов получает импульс к выработке антител [9]. Поэтому для оценки влияния изучаемых препаратов на В-клеточное звено иммунитета наиболее информативным показателем является исследование продукции антител. Данная интегральная характеристика отражает процессы пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов и состояние регуляторных механизмов, ответственных за эти процессы [9].

В этой связи основной задачей при изучении влияния «Витанамна» В-клеточное звено иммунитета являлась оценка его действия на продукцию антител в тестах прямой гемагглютинации [3] и локального гемолиза в агаровом геле по Эрне [4].

Важной характеристикой функциональной активности В-лимфоцитов является их способность к поликлональному ответу на В-клеточный митоген – бактериальный липополисахарид (LPS). Так как ответ на LPS является Т-независимым, эффект изучаемого препарата, обладающего иммуномодулирующим действием, может означать его непосредственное влияние на В-лимфоциты либо опосредованное действие через регуляторные клетки, не являющиеся Т-лимфоцитами (например, макрофаги).

### Влияние препарата «Витанам» на титр агглютининов к эритроцитам барана в сыворотке крови в тесте прямой гемагглютинации

Тест основан на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, агглютинировать эритроциты барана (ЭБ), используемые в качестве антигена.

Исследования выполнены на 40 мышах линии СВА и 40 мышах линии С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> (самцы, масса тела 18–20 г), разделенных на 4 группы по 10 мышей СВА и 10 мышей

С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> в каждой. Титры гемагглютининов определяли у двух оппозитно реагирующих на эритроциты барана линий мышей, С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> (низкоотвечающие) и СВА (высокоотвечающие). Мышей иммунизировали внутривентральным введением суспензии эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе  $3 \times 10^7$  клеток. Животным 2-й и 3-й групп одновременно с иммунизацией внутривентрально вводили «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг. Мыши 4-й группы на фоне иммунизации ЭБ получали 3-кратно в желудок (в день иммунизации и в два последующих дня) изучаемый препарат в дозе 5 мг/кг. Животные 1-й группы не получали «Витанам» и служили контролем. На 7-е сутки после иммунизации получали сыворотку крови мышей, которую для инактивации комплемента прогревали при 560 °С в течение 30 мин. Для определения титра агглютининов (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчетливая агглютинация ЭБ) в лунки микропланшетов для иммунологических реакций вносили по 50 мкл 0,15 M NaCl. В первую лунку добавляли 50 мкл сыворотки крови, перемешивали пипеточным дозатором и переносили по 50 мкл из одной лунки в другую. В каждую лунку добавляли по 25 мкл 1% суспензии ЭБ. Планшеты встряхивали и инкубировали при комнатной температуре 2,5 ч, после чего просматривали результаты реакции гемагглютинации. Титры агглютининов к ЭБ выражали величиной  $\log_2 T$ , где T – титр антител исследуемой сыворотки [3].

Таблица 2.

Влияние препарата «Витанам» на титр гемагглютининов ( $\log_2 T$ ) к эритроцитам барана в сыворотке крови мышей линий СВА и С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> при иммунизации эритроцитами барана в субоптимальной дозе

Группы	Доза и способ введения препарата «Витанам»	Линии мышей	
		СВА	С <sub>57</sub> BL <sub>6</sub>
		$\log_2 T$	$\log_2 T$
1	контроль	3,80±0,41	3,50±0,55
2	в/б однократно 5 мг/кг	4,50±0,42	3,67±0,65
3	в/б однократно 10 мг/кг	4,67±0,62	4,33±0,36*
4	в/ж трехкратно 5 мг/кг	4,67±0,65	3,83±0,76

Результаты проведенных исследований показали, что «Витанам» усиливает продукцию антиэритроцитарных антител на субоптимальную дозу ЭБ во всех используемых дозах и способах введения у мышей СВА и при в/б разовой инъекции в дозе 10 мг у мышей С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> (таблица 2). При ответе на субоптимальную дозу антигена «Витанам» усиливает антителогенез, но титры гемагглютининов не достигают уровня, регистрируемого при иммунизации оптимальной дозой ЭБ.

### Влияние препарата «Витанам» на количество антителообразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных эритроцитами барана

Прямой метод локального гемолиза, основанный на способности антиэритроцитарных антител в присутствии комплемента лизировать эритроциты барана в агаровом геле с образованием зон гемолиза вокруг антителообразующих клеток (АОК), был предложен [4] для оценки влияния препаратов и химических веществ на иммунный ответ.

Исследования выполнены на 32 мышах линии СВА и 32 мышах линии С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> (самцы, масса тела 18–20 г), которые были разделены на 4 группы по 8 мышей СВА и С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub> в каждой. Мышей иммунизировали внутривенным введением ЭБ, отмытых в стерильном физиологическом растворе в субоптимальной иммуногенной дозе  $3 \times 10^7$  клеток/мышь. Мышам 2-й и 3-й групп внутрибрюшинно вводили «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно. Мыши 4-й группы на фоне иммунизации ЭБ получали 3-кратно в желудок препарат в дозе 5 мг/кг (в день иммунизации и в 2 последующих дня), животные 1-й группы внутрибрюшинно получали физиологический раствор и служили контролем. На 4-е сутки после иммунизации определяли число АОК в селезенке по методу Эрне.

Как видно из таблицы 14, под влиянием «Витанам» при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг и при 3-кратном введении в желудок в дозе 5 мг/кг мышам двух использованных линий наблюдается усиление иммунного ответа на эритроциты барана и увеличение количества АОК.

Таблица 3.

Влияние препарата «Витанам» на количество антителообразующих клеток (АОК) у мышей линий СВА и С<sub>57</sub>BL<sub>6</sub>, иммунизированных ЭБ (представлены средние геометрические и доверительные интервалы)

Группы животных, испытанные дозы препарата и способ введения	Количество АОК на селезенку мышей линий СВА и С <sub>57</sub> BL <sub>6</sub> , $1 \times 10^4$	
	СВА	С <sub>57</sub> BL <sub>6</sub>
1. Группа – контроль (физиологический раствор)	5,81 (4,51÷7,12)	2,78 (1,90÷3,67)
2. Группа – нуклеотидный препарат в/б 5 мг/кг	5,12 (3,91÷7,02)	2,51 (2,24÷2,77)
3. Группа – нуклеотидный препарат в/б 10 мг/кг	9,18 (7,86÷10,51)**	7,35 (6,25÷8,45)**
4. Группа – нуклеотидный препарат в/ж 3-кратно 5 мг/кг	7,07 (5,60÷8,53)*	6,03 (4,90÷7,15)**

В наименьшей из испытанных доз – 5 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении мышам препарата «Витанам» не оказывал иммуностимулирующего действия при иммунизации животных эритроцитами барана.

### Влияние препарата «Витанам» на бласттрансформацию В-лимфоцитов селезенки, индуцируемую липополисахаридом

Ранее было отмечено, что важной характеристикой функциональной активности В-лимфоцитов является их способность к поликлональному ответу на селективный В-клеточный митоген – бактериальный липополисахарид (LPS). Если изучаемый препарат оказывает влияние на бласттрансформацию В-лимфоцитов при стимуляции LPS, то этот эффект обусловлен непосредственным влиянием на регуляторные клетки, которые не являются Т-лимфоцитами.

Исследования выполнены на 32 мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20), которые были разделены на 4 группы по 8 мышей в каждой. Определение проводили по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5].

В результате проведенных исследований установлено, что «Витанам» в диапазоне испытанных концентраций 1–100 мкг/мл не влияет на индукцию бактериальным липополисахаридом бласттрансформации В-лимфоцитов селезенки мышей линии СВА. Следовательно, «Витанам» не оказывает прямого иммуномодулирующего влияния на В-лимфоциты при поликлональной стимуляции липополисахаридом и выявленное его стимулирование гуморального иммунитета (увеличение титра гемагглютининов и числа АОК) свидетельствует об опосредованных механизмах действия препарата на В-лимфоциты через модификацию регуляторных клеток звеньев иммунитета.

Отсутствие прямого иммуномодулирующего влияния на В-лимфоциты при поликлональной стимуляции липополисахаридом может также быть связано с тем, что Витанам является селективным активатором Ca<sup>2+</sup>-зависимой NO-синтазы, а LPS, как было показано O. Xie с соавт. [10], является индуктором экспрессии iNOS, которая не является конститутивно экспрессируемой в большинстве тканей и органов и индуцируется посредством индукции LPS промотора – бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

### Исследование влияния препарата «Витанам» на Т-клеточное звено иммунитета

Т-лимфоцитам принадлежит роль координатора функций гуморального и клеточного иммунитета, а также непосредственного участника реакций клеточного иммунитета [11]. При анализе иммуномодулирующего действия препарата «Витанам» на В-лимфоциты (гуморальный иммунный ответ) были получены косвенные доказательства участия Т-клеток в реализации эффектов изучаемого препарата на систему иммунитета.

Т-лимфоциты – функционально гетерогенная популяция. В ее состав входят клетки, выполняющие вспомогательную (Т-хелперы типов 0; 1 и 2); супрес-

сорную (Т-супрессоры) и цитотоксическую (Т-киллеры) функции. Т-лимфоциты при антигенной стимуляции продуцируют широкий спектр цитокинов и могут находиться под ауто- и паракринным влиянием данных факторов, а также через продукцию этих медиаторов влиять на другие типы клеток иммунной системы. На поверхности Т-лимфоцитов представлены рецепторы для цитокинов и других сигнальных молекул, воспринимающих информацию от других клеток иммунной системы.

В связи с этим представляется целесообразным оценить влияние препарата «Витанам» на функциональную активность суммарной популяции Т-лимфоцитов *in vitro* (поликлональная активация Т-клеточными митогенами), а также на отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов: эффекторы гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (Т-хелперы типа 1) и Т-клетки – продуценты интерлейкина-2 (преимущественно Т-хелперы типов 0, 1 и 2).

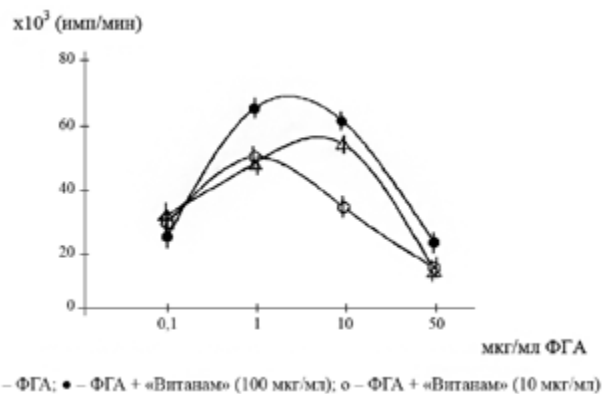
**Влияние препарата «Витанам» на поликлональную активацию, индуцируемую Т-клеточными митогенами – фитогемагглютинином и конканавалином А**

Оценку влияния препарата «Витанам» на бласттрансформацию Т-лимфоцитов проводили по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5]. Принцип этого метода состоит в том, что под воздействием митогенов фитогемагглютинина (ФГА) и конканавалина А (Кон А) происходит поликлональная активация Т-лимфоцитов, на которую могут влиять изучаемые лекарственные препараты и химические вещества, изменяя при этом функциональное состояние (иммунореактивность) Т-лимфоцитов.

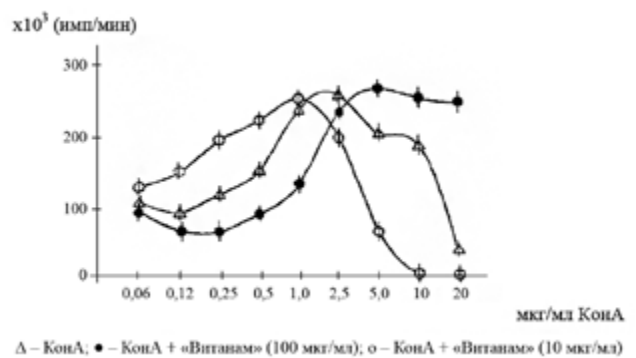
Исследования выполнены на 24 мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20 г), которые были разделены на 3 группы по 8 мышей в каждой. «Витанам» в изучаемых дозах 10 и 100 мг/кг вводили мышам внутривентриально 3 раза через каждые 2 дня. Контрольной группе животных вводили среду 199 при тех же условиях в объемах, соответствующих объемам вводимого препарата. На 8-е сутки после последнего введения препарата «Витанам» мышам забивали и извлекали селезенку, которую гомогенизировали в среде А. Клетки центрифугировали 5 мин при 200 г 3 раза. К осадку клеток добавляли 2 мл среды В. В качестве митогенов использовали ФГА и КонА («Серва», Германия) в концентрациях 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 10 и 20 мкг/мл и 0,1; 1,0; 10 и 50 мкг/мл соответственно. Реакцию проводили в 96-луночных круглодонных планшетах. Культивирование проводили в объеме 200 мкл (100 мкл ФГА и КонА + 100 мкл взвеси клеток  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл) в  $CO_2$ -инкубаторе (5%  $CO_2$ ) в течение 72 ч. В контроле ставили реакцию на спонтанную пролиферацию клеток селезенки без митогена. Пролиферацию и бласттрансформацию Т-лимфоцитов оценивали по количеству меченого  $^3H$ -тимидина (Amersham, США), включенного в ДНК лимфоцитов. Результаты выражали в имп/мин.

Как видно из рисунка 1, «Витанам» в дозе 100 мкг/мл усиливает пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, индуцируемый ФГА в дозах 1 и 10 мкг/мл. «Витанам» в дозе 10 мкг/мл усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов на ФГА в концентрации 10 мкг/мл.

На основании результатов, представленных на рисунке 2, можно заключить, что «Витанам» оказывает резко выраженное нейтрализующее действие на активность КонА, что выражается в пропорциональном смещении кривых «доза – ответ». Препарат дозозависимо усиливает ответ Т-лимфоцитов на высокие дозы КонА (2,5–20,0 мкг/мл) и угнетает ответ на малые (0,06–0,5 мкг/мл) и оптимальную (1,0 мкг/мл) дозы митогена.



**Рисунок 1.** Влияние препарата «Витанам» на пролиферацию Т-лимфоцитов селезенки мышей СВА, индуцируемую ФГА



**Рисунок 2.** Влияние препарата «Витанам» на пролиферацию Т-лимфоцитов селезенки мышей СВА, индуцируемую КонА

**Влияние нуклеотидного препарата на реакцию гиперчувствительности замедленного типа**

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) – иммунная воспалительная реакция, характеризующаяся относительно медленным развитием и инфильтрацией межтканевой лейкоцитами, с преобладанием Т-лимфоцитов. Морфологические проявления реакции (отек, индукция и т.д.) обусловлены продукцией широкого спектра цитокинов, вырабатываемых Т-лимфоцитами и нелимфоидными

вспомогательными клетками, инфильтрирующими пораженную ткань [12].

ГЗТ – антигенспецифическая реакция, главную роль в которой играют Т-хелперы типа 1, стимулирующие созревание предшественников Т-эффекторов ГЗТ. В регуляцию ГЗТ вовлечены Т-супрессоры нескольких типов. Модельная система ГЗТ позволяет получить данные об интегральной функции Т-лимфоцитов в классической системе Т-клеточного иммунитета [13].

Исследования выполнены на 30 мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20 г), которые были разделены на 3 группы по 10 животных в каждой. Мышей иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе  $1 \times 10^7$  клеток/мышь. Мышам 2-й и 3-й групп в день иммунизации внутрибрюшинно вводили «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг. Контрольные мыши 1-й группы получали внутрибрюшинно соответствующие количества физиологического раствора, использованного для растворения препарата. На 5-е сутки после иммунизации все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе  $1 \times 10^7$  клеток/мышь в объеме 50 мкл. В подушечку контрлатеральной лапы (контрольная лапа) инъецировали 50 мкл стерильного физиологического раствора. Результаты реакции регистрировали через 24 ч по соотношению величины отека стоп опытной и контрольной лап, который определяли с помощью микрометра. Разница в объеме опытной и контрольной лап характеризовала величину отека и интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа. Индекс реакции (И) вычисляли по формуле:

$$И = ((P_0 - P_k) / P_k) \times 100,$$

где  $P_0$  и  $P_k$  – объемы опытной и контрольной лап.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4.

**Влияние препарата «Витанам» при внутрибрюшинном введении мышам линии СВА на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа**

Группы животных, испытываемая доза препарата	Индекс реакции
1 группа – контроль	33,3±6,1
2 группа – «Витанам», 5 мг/кг	26,4±6,9
3 группа – «Витанам», 10 мг/кг	26,9±5,9

Данные таблицы 4 свидетельствуют о том, что «Витанам» в испытанных дозах 5 и 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении мышам линии СВА несколько угнетает реакцию ГЗТ, индуцированную ЭБ. Однако этот эффект был слабовыраженным, и показатели индекса реакции у 2-й и 3-й групп, получавших «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг, статистически достоверно не отличались от показателей контрольной группы.

### **Влияние препарата «Витанам» на продукцию интерлейкина-2 спленоцитами мышей линии BALB/c, стимулированными конканавалином А**

Продукция интерлейкина-2 (ИЛ-2) является одним из основных показателей функциональной активности Т-клеток, а именно Т-хелперов. ИЛ-2 служит медиатором межклеточных взаимодействий гликопротеидной природы. Его участие необходимо для выработки антител и развития иммунного ответа, реакций клеточного иммунитета, пролиферации, Т- и В-лимфоцитов, генерирования лимфокинактированных киллеров и усиления активности клеток, опосредующих естественную противоопухолевую резистентность организма.

Исследование продукции ИЛ-2 проводили по методу А. Reske-Kunz et al. [14]. Продуцентами ИЛ-2 являлись клетки селезенки мышей линии BALB/c, которым вводили «Витанам» в дозах 10, 50 и 100 мг/кг внутрибрюшинно 3 раза через каждые 2 дня. Контрольной группе животных вводили среду 199 при тех же условиях в объемах, соответствующих объемам вводимого препарата. На 8-е сутки после последнего введения препарата «Витанам» мышей забивали и извлекали селезенку, которую гомогенизировали (см. раздел «Материалы и методы»).

Для индукции ИЛ-2 использовали клетки селезенки мышей BALB/c, стимулированные КоНА в присутствии препарата «Витанам» или без него (таблица 5).

Таблица 5.

**Влияние препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 клетками селезенки мышей BALB/c, стимулированными КоНА**

Группы животных, испытываемые препараты и дозы	Уровень выработки ИЛ-2, или $^3H$ -тимидина в мин
1 группа – КоНА	9,45±4,40
2 группа – «Витанам», 10 мг/кг	Менее 1
3 группа – «Витанам», 50 мг/кг	Менее 1
4 группа – «Витанам», 100 мг/кг	Менее 1
3 группа – КоНА + «Витанам», 10 мг/кг	9,49±4,31
3 группа – КоНА + «Витанам», 50 мг/кг	7,00±3,83
3 группа – КоНА + «Витанам», 100 мг/кг	5,31±2,31

Из приведенных в таблице 5 данных следует, что «Витанам» дозозависимо угнетает индуцируемую КоНА продукцию ИЛ-2 клетками селезенки мышей BALB/c.

### **Влияние препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными фитогемагглютинином**

В данном разделе исследований по оценке влияния препарата «Витанам» на выработку ИЛ-2 его продуцентами являлись лимфоциты донорской крови,

стимулированные фитогемагглютинином. Оценку влияния препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными ФГА, проводили по методу M. Lyte [8]. 100 мкл гепаринизированной венозной донорской крови вносили в ячейки 24-луночных панелей и добавляли 90 мкл среды Б, содержащей 20 мкг ФГА и «Витанам» в конечных концентрациях 10, 50 или 100 мкг/мл. Клетки инкубировали 48 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации отбирали надосадки и хранили при –20 °С. Последующее тестирование активности ИЛ-2 проводили на Т-бластах мышей BALB/c в соответствии с методическими приемами, описанными в разделе «Материалы и методы».

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6.

**Влияние препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 лимфоцитами донорской крови, стимулированными фитогемагглютинином**

Группы, испытываемые препараты и дозы	Уровень выработки ИЛ-2 или <sup>3</sup> H-тимидина в мин	
	Донор №1	Донор №2
1 группа – ФГА	6,06	8,03
2 группа – «Витанам», 10 мкг/мл	Менее 1	Менее 1
3 группа – «Витанам», 50 мкг/мл	Менее 1	Менее 1
4 группа – «Витанам», 100 мкг/мл	Менее 1	Менее 1
3 группа ФГА + «Витанам», 10 мкг/мл	5,44	8,80
3 группа ФГА + «Витанам», 50 мкг/мл	5,63	8,96
3 группа ФГА + «Витанам», 100 мкг/мл	5,99	8,10

Из представленных в таблице 6 данных видно, что «Витанам» в испытанных концентрациях и в использованной схеме постановки эксперимента существенно не влияет на продукцию интерлейкина-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными фитогемагглютинином.

Результаты проведенных исследований по оценке иммуномодулирующих свойств препарата «Витанам» из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14 совпадают с данными различных авторов, изучавших механизмы действия на иммунную систему нуклеината натрия – ближайшего аналога препарата из дрожжей, которые показали, что нуклеинат натрия повышает функциональную активность Т-лимфоцитов [15–16].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги изучения иммуномодулирующих свойств комплексного нуклеотидного препарата, полученного из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14, можно отметить, что препарат при введении мышам в дозах 5 и 10 мг/кг усиливает гуморальный иммунный

ответ на эритроциты барана и подавляет реакцию ГЗТ на этот антиген.

В системе *in vitro* «Витанам» в концентрациях 1–100 мкг/мл не влияет на индуцируемую LPS пролиферацию В-клеток селезенки и модифицирует митогенный ответ Т-клеток на ФГА и Кона.

Таким образом, «Витанам» является иммуномодулятором широкого спектра действия, причем эффект препарата проявляется и при его пероральном введении.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ по Программе реализации комплексных проектов по созданию высокотехнологичного производства (постановление Правительства РФ № 218 от 09.04.2010 г., шифр конкурса 2016-218-09). Договор № 03.G25.310258.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. A.V. Shmigol, D.A. Eisner, S. Wray. Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic // *Physiology*. 2001. V. 531. P. 707–713.
2. N.J. Willmott, K. Wong, A.J. Strong. A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca<sup>2+</sup> waves in glia // *Neurosci*. 2000. V. 20. P. 1767–1779.
3. Г.П. Кудрина и др. Метод, рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. – М. 1992.
4. N.K. Jerne, A.A. Nordin. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells // *Science*. 1963. V. 140. P. 405–411.
5. Б.Б. Фукс, В.В. Хоробрых, А.Ф. Коркин. Методы постановки реакций бласттрансформации в микромодификации // *Иммунология*. 1983. № 3. С. 76–79.
6. Е.Ю. Гусев и др. Интегративные составляющая кальцийсвязывающих белков. – М.: БЭБиМ, 1991. № 9. С. 271.
7. Г.Т. Сухих и др. Радиометрическое определение ИЛ-2 в препаратах клеток // *Докл. АН СССР* 1984. Т. 278. № 3. С. 762.
8. M. Lyte. Generation and measurement of interleukin-2, and mitogen levels in small volumes of whole blood // *J. Clin. Lab. Anal.* 1987. P. 83–88.
9. C.D. Myers. Role of B cell antigen processing and presentation in the humoral immune response // *FASEB*. V. 5. P. 2547–2553.
10. O. Xie, C. Nathan. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation // *J. of Leucocyte Biology*. 1994. V. 56. P. 576–582.
11. Б. Альбертс, Д. Брей, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Д. Уотсон. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1994. 504 с.
12. Р.В. Петров и др. Метод, материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. – М. 1984.
13. D.F. Fiorentino, M.W. Bond, T.R. Mosmann. 2 type of mouse T-helper cell. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones // *J. of Experimental Medicine*. 1989. V. 170. P. 2081–2095.
14. A. Reske-Kunz, H. Osawa, O. Josimovic-Alasevic et al. Soluble interleukin 2 receptor (Tac chain) is not a reliable marker in kidney transplant recipient monitoring // *J. Immunol*. 1983. V. 138. P. 192–196.
15. А.М. Земсков, В.М. Земсков, А.В. Петров. Роль нуклеината натрия в систем иммунитета // *Иммунология*. 1984. № 4. С. 76.
16. В.Г. Передерий, А.М. Земсков. Влияние нуклеината натрия на Т-клеточную систему иммунитета // *Врач. дело*. 1988. № 8. С. 71.