

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ЛАОДЖАН» НА ПАРАМЕТРЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В. А. Козлов, О. П. Колесникова, О. Т. Кудаева, К. А. Лузянин

ГУНИИ клинической иммунологии СО РАМН,
Центр традиционной китайской медицины «Гринспринг»
Новосибирск, Россия

РЕЗЮМЕ

В эксперименте на лабораторных животных исследовано влияние препарата китайской медицины «Лаоджан» на параметры клеточного и гуморального звеньев иммунной системы. Изучены функциональные свойства Т- и В-клеток *in vitro*, выраженность реакции клеточного иммунитета в тесте интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), первичный и вторичный IgM- и IgG-ответ на тимус-зависимый антиген *in vivo*. Показано, что многократное введение препарата в течение длительного времени стимулирует гуморальное и подавляет клеточное звено иммунного ответа на Т-зависимый антиген, не влияя на иммунную память, а также оказывает действие на функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, определяемую в культуре *in vitro*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Лаоджан
гуморальный и клеточный иммунный ответ
функциональная активность лимфоцитов

ABSTRACT

In laboratory environment there has been examined the effect of «Laojun» remedy administration on the cellular and humoral immunity components of laboratory animals. The functional activity of T- and B- lymphocytes *in vitro*, intensity of the cellular immunity reaction in the test of delayed type hypersensitivity, primary and second IgM and IgG humoral immune response on the thymus-dependent antigen *in vivo* have been studied. It is shown that multiple-dose introduction of this remedy over a long period of time stimulates the humoral component and suppresses the cellular one of immune response on the T-dependant antigen, having no effect on the immune memory cells. It also exerts influence on the functional activity of T- and B-lymphocytes, fixed in culture *in vitro*.

KEYWORDS

Laojun remedy
humoral and cellular immune response
functional activity of lymphocytes

Введение

В настоящее время широкое распространение получили так называемые биологически активные добавки (БАДы), которые, не являясь лекарственными препаратами, оказывают нормализующее, укрепляющее, стимулирующее воздействие на многие физиологические системы и органы. По многолетним наблюдениям китайских специалистов, биологически активная добавка «Лаоджан» является уникальным средством, замедляющим процессы старения организма человека. Лаоджан представляет собой отвар из корней, стеблей, листьев, цветов и плодов 19 растений северных горных районов Китая. Препарат богат витаминами (аскорбиновая кис-

лота, каротин, флавоноиды, рибофлавин, токоферолы, пиридоксин, тиамин и т.д.), аминокислотами, полисахаридами; содержит такие микроэлементы, как хром, медь, цинк, марганец, селен, железо, калий, натрий, кальций, магний, и многие другие вещества.

Иммунная система во многом определяет физиологическое состояние и, следовательно, нормальное функционирование организма. Для изучения механизма стимулирующего влияния препарата «Лаоджан» на организм было исследовано его действие на параметры иммунной системы экспериментальных животных в опытах *in vitro* и *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

В опытах использовали мышей-гибридов (СВАхС57BL/6) F1, самцов в возрасте 2–3 месяцев, полученных из питомника «Рассвет» (Томск) и экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Водный раствор «Лаоджан» вводили внутривентриально с помощью зонда в дозе, соответствующей рекомендованной для человека, с учетом массы животных и интенсивности процессов их метаболизма — 20 мкл/мышь в объеме 0,5 мл ежедневно (5 раз в неделю, перерыв 2 дня) в течение месяца. Контрольная группа получала внутривентриально воду — в те же сроки и в том же количестве.

По окончании курса введения препарата оценивали параметры иммунной системы *in vivo* — иммунный ответ на антиген и *in vitro* — функциональные свойства лимфоидных клеток. Для этого часть мышей иммунизировали тимус-зависимым антигеном — эритроцитами барана в оптимальной дозе внутривенно, другую часть мышей забивали, забирали селезенки, готовили клеточную суспензию и исследовали пролиферативную активность клеток (спонтанную и митоген-индуцированную) и их способность продуцировать иммуноглобулины (спонтанную и стимулированную).

Иммунный ответ на тимус-зависимый антиген — эритроциты барана (ЭБ) оценивали после иммунизации субоптимальной дозой антигена. Определяли параметры гуморального ответа (количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке — IgM- и IgG-АОК при первичном и IgG-АОК при вторичном ответе) и клеточного (интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа — ГЗТ).

Гуморальный иммунный ответ на ЭБ оценивали на пике ответа — на четвертые (IgM-АОК) и девятые (IgG-АОК) сутки при первичном ответе и на пятые сутки (IgG-АОК) при вторичном ответе — по количеству локальных зон гемолиза в жидкой среде после внутривенного введения 1×10^7 ЭБ [3].

У мышей после дислокации позвоночника забивали селезенки и готовили клеточную суспензию. Все процедуры с клетками проводили на льду. Затем готовили инкубационную смесь: 300 мкл среды, 100 мкл суспензии ЭБ (4×10^9 ЭБ/мл),

100 мкл сыворотки морской свинки, предварительно разведенной в 1,5 раза, и 500 мкл клеточной суспензии (при определении IgM-АОК); 200 мкл среды, 100 мкл суспензии ЭБ (4×10^9 ЭБ/мл), 100 мкл свежей сыворотки морской свинки, предварительно разведенной в 1,5 раза, 100 мкл кроличьей антисыворотки, предварительно разведенной в 20 раз, и 500 мкл клеточной суспензии (при определении IgG-АОК). Компоненты перемешивали, смесь заливали в стеклянные камеры, сделанные из двух предметных стекол, склеенных смесью воска с парафином вдоль продольных сторон. Учитывали объем камеры. Камеры помещали в термостат и инкубировали при $t = +37^\circ\text{C}$ 90 мин (при определении IgM-АОК) и 120 мин (при определении IgG-АОК). После инкубации подсчитывали зоны гемолиза под бинокулярной лупой (увеличение — 42):

$$\text{Абсолют. АОК} = \frac{A \times B \times C}{D},$$

где А — количество АОК на камеру; В — объем клеточной суспензии; С — разведение; D — объем камеры.

Клеточный иммунитет оценивали по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ): по величине отека лапы после введения разрешающей дозы ЭБ сенсибилизированным животным. Для этого предварительно иммунизировали мышей внутрибрюшинно. Сенсибилизирующая доза — 0,25% ЭБ в объеме 0,5 мл ($2,5 \times 10^7$ ЭБ/мышь). Разрешающую дозу — 50% ЭБ в объеме 50 мкл (5×10^8 ЭБ/мышь) вводили под подошвенный апоневроз правой задней лапы на 4-е сутки. В контралатеральную лапу вводили среду в том же объеме. Учет реакции проводили через 24 часа по величине местного отека. Результаты выражали в абсолютных (разность между отеком лапки, в которую были введены ЭБ, и отеком контралатеральной лапки) и относительных (отношение разности между отеком лапки, в которую были введены ЭБ, и отеком контралатеральной лапки к отеку контралатеральной лапки) единицах [4]. Культивирование лимфоидных клеток и оценивание их функциональных свойств (пролиферативный ответ на Т- и В-клеточные митогены и синтез IgG) проводили согласно общепринятым методикам.

Спленоциты мышей получали в стерильных условиях, как описано выше. Полученную клеточную суспензию доводили до концентрации $0,7 \times 10^6$ клеток/мл полной среды RPMI-164, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 10 мМ Нерес, 4×10^{-5} М 2-меркапто-этанола, 2 мМ L-глутамина, 50 мкг/мл ген-

тамицина, и помещали в 96-луночные круглодонные планшеты для культивирования по 100×10^3 клеток на лунку. Оптимальные дозы LPS E.coli 055:B5, Con A, PWM, определенные в предварительных опытах, составили 30 мкг/мл, 2 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно. Инкубацию клеточной культуры проводили при $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , в течение 72 часов. За 16 часов до конца инкубации во все лунки добавляли по 1 мкКи ^3H -тимидина. По окончании инкубации клетки собирали на стекляннно-волоконистые фильтры (Flow Lab) с помощью аппарата «Harvester» (TITERTEK). Фильтры помещали во флаконы для сцинтилляционного счета, радиоактивность подсчитывали в сцинтилляторе (4 г дифенилоксазола и 0,1 г дифенилоксазолилбензола на 1 л толуола) в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Дельта» (США). Результаты оценивали в имп./мин на 100×10^3 клеток. Оценка данных проводилась как в абсолютных значениях, так и в индексах стимуляции (ИС).

$$\text{ИС} = \frac{E - F}{F} \times 100\%,$$

где E — имп./мин митогениндуцированной пролиферации; F — имп./мин спонтанной пролиферации.

Для оценки спонтанного и LPS-стимулированного синтеза IgG in vitro клетками селезенки клеточную суспензию спленоцитов культивировали, как описано выше, в течение 7 суток. Оптимальная доза LPS, определенная в предварительных опытах, составила 30 мкг/мл. По окончании инкубации супернатант собирали в пробирки и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. После этого супернатант разносили в пробирки для микропроб и хранили при -20°C до тестирования.

Определение IgG в периферической крови и супернатантах спленоцитов проводили методом ELISA [1].

96-луночные плоскодонные планшеты (Linbro E.I.A. или Costar) сенсibilizировали антителами против анализируемых IgG (антитела кролика против цельной молекулы IgG мыши, рабочая концентрация — 2–5 мкг/мл) в 0,1 М натрий карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,8, и инкубировали 4 часа при комнатной температуре и в течение ночи при $+4^\circ\text{C}$. Для исключения неспецифического связывания планшет обрабатывали 0,1-процентным раствором желатина в забуференном физрастворе (ЗФР) в течение 1 часа при $+37^\circ\text{C}$. После этого лунки заполняли стандартным раствором IgG (концентрация от 10–140 нг/мл) и анализируемыми образцами. Супернатант спленоцитов использовали в разведении 1:100. Ин-

кубировали 2 часа при $+37^\circ\text{C}$. Далее платы обрабатывали раствором антител кролика против цельной молекулы IgG мыши, меченных пероксидазой хрена в разведении 1:1000, и инкубировали 1 ч 30 мин при $+37^\circ\text{C}$, а затем с субстратом — ортофенилендиаминдигидрохлоридом (ОФД) в 0,15 М цитратном буфере, содержащем 0,35 мл 3-процентного (по объему) раствора H_2O_2 30 мин при $+37^\circ\text{C}$. Фермент-субстратную реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку 50 мкл 3М раствора серной кислоты. Интенсивность реакции оценивали на аппарате «Multiskan» (Titertek) при длине волны λ 492 нм. Количественный анализ IgG проводили по построенной для каждого планшета калибровочной кривой. Уровень неспецифического связывания с пластиком меченых антител и субстратной смеси оценивали как фоновый.

Результаты выражали как в абсолютных значениях (мг/мл, мкг/мл), так и в индексах влияния (ИВ).

$$\text{ИВ} = \frac{G - H}{H},$$

где G — LPS-стимулированный синтез IgG; H — спонтанный синтез IgG.

Учитывая, что распределение изучаемых параметров отличалось от нормального, статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни [2].

Результаты

Влияние препарата на гуморальный ответ на тимус-зависимый антиген

Длительное введение препарата «Лаоджан» вызывает значительную — в 3 раза — стимуляцию первичного гуморального иммунного ответа, причем его более эффективной в протективном отношении ветви — IgG-ответа. Для изучения влияния препарата на вторичный гуморальный ответ использовали две схемы введения препарата: в первом случае препарат вводили только до момента первой иммунизации в течение месяца, во втором случае животные продолжали получать препарат до второй иммунизации, то есть суммарно в течение двух месяцев. Не обнаружено изменения количества АОК при вторичном ответе.

экспериментальные исследования

Таблица 1. Количество IgM-AOK в селезенке при первичном иммунном ответе; $M \pm m$; min – max, различия не достоверны ($p > 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1	3 001 2 062–4 602	6 811 3 656–9 456
Опыт 2	4 450 1 676–7 984	3 530 1 918–5 938
Среднее по двум опытам	3 829 1 676–7 984	5 170 1 918–9 456

Таблица 2. Количество IgG-AOK в селезенке при первичном иммунном ответе; $M \pm m$; min – max, различия достоверны ($p < 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1	3 638 0–9 196	9 882 4 018–20 512
Опыт 2	9 29 25 464–17 299	31 488 4 529–77 902
Среднее по двум опытам	6 465 0–17 299	20 685 4 018–77 902

Таблица 3. Количество IgG-AOK в селезенке при вторичном иммунном ответе (схема 1, введение препарата в течение месяца до первой иммунизации); $M \pm m$; min – max, различия не достоверны ($p > 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1	29 444 16 818–52 446	17 442 9 419–28 083
Опыт 2	161 121 124 658–190 870	160 268 98 571–203 279
Среднее по двум опытам	85 877 16 818–190 870	88 855 9 419–203 279

Таблица 4. Количество IgG-AOK в селезенке при вторичном иммунном ответе (схема 2, введение препарата в течение месяца до первой иммунизации и далее в течение месяца до второй иммунизации); $M \pm m$; min – max, различия не достоверны ($p > 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1	158 112 85 143–209 135	174 805 141 518–239 286
Опыт 2	544 900 92 857–701 786	645 311 557 143–748 214
Среднее по двум опытам	85 877 16 818–190 870	88 855 9 419–203 279

Влияние препарата на клеточный ответ

Введение препарата снижает выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа, отражающей состояние клеточного звена, что согласуется с существующими наблюдениями о противоположно направленных тенденциях развития гуморального и клеточного звеньев иммунной реакции, в том числе под влиянием различных воздействий.

Таблица 5. Выраженность реакции ГЗТ в процентах; $M \pm m$; min – max, различия достоверны ($p < 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1	44,1 21,7–57,1	36,2 28,6–42,8
Опыт 2	35,9 15,0–50,0	18,8 8,7–36,4
Среднее по двум опытам	40,0 15,0–57,1	27,4 8,7–42,8

Влияние препарата на митоген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов

Длительное введение препарата «Лаоджан» вызывает значительное снижение спонтанной пролиферации лимфоцитов, не снижая их способности (абсолютные значения пролиферации) отвечать на стимулирующие воздействия; это приводит к значительному возрастанию индекса пролиферации в отношении как Т-, так и В-митогенов.

Таблица 6. Пролиферативная активность клеток селезенки; M , min – max, различия достоверны только для спонтанной пролиферации ($p < 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1		
Спонтанная	1 495 625–2 862	888 320–1 308
LPS стимулированная	23 415 19 385–28 118	20 948 15 808–25 032
PWM-стимулированная	12 362 6 675–16 765	13 440 7 578–18 102
ConA-стимулированная	24 540 18 980–28 285	25 770 15 512–32 410
Опыт 2		
Спонтанная	3 552 1 275–7 555	892 498–1 105
LPS-стимулированная	16 955 11 578–20 658	14 490 12 800–17 212
PWM-стимулированная	12 035 10 155–13 460	11 860 9 120–15 720
ConA-стимулированная	20 035 16 805–25 672	17 365 13 915–19 198
Среднее по двум опытам		
Спонтанная	2 524 625–7 555	890 320–1 308
LPS-стимулированная	20 185 11 578–28 118	17 718 12 800–25 032
PWM-стимулированная	12 200 6 675–16 765	12 650 7 578–18 102
ConA-стимулированная	22 288 16 805–28 285	21 568 13 915–32 410

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 7. Индексы пролиферации клеток селезенки в ответ на митогены; M, min – max, различия между контрольной и опытными группами достоверны для всех параметров ($p < 0,05$)

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1		
Пролиферация LPS-стимулированная	19,4 8,8–35,8	27,6 17,4–48,4
PWM-стимулированная	10,0 3,8–21,5	15,8 12,5–22,7
ConA-стимулированная	21,4 8,6–44,2	32,2 21,0–47,5
Опыт 2		
Пролиферация LPS-стимулированная	6,8 1,6–11,8	17,3 12,1–26,5
PWM-стимулированная	4,6 0,3–9,6	13,8 9,7–20,7
ConA-стимулированная	7,4 2,4–12,2	21,6 15,5–37,6
Среднее по двум опытам		
Пролиферация LPS-стимулированная	13,1 1,6–35,8	22,4 12,1–48,4
PWM-стимулированная	7,3 0,3–21,5	14,8 9,7–22,7
ConA-стимулированная	14,4 2,4–44,2	26,9 15,5–47,5

Влияние препарата на спонтанную и митоген-индуцированную продукцию IgG

Спонтанная продукция иммуноглобулинов под влиянием препарата не меняется, тогда как стимулированная — падает, что приводит к достоверному снижению индекса стимуляции.

Таблица 8. Продукция IgG клетками селезенки (концентрация IgG в супернатанте семидневных клеточных культур в мкг/мл); M, min – max, различия достоверны ($p < 0,05$) для LPS-стимулированной продукции IgG и индекса стимуляции

	Контрольная группа	Опытная группа
Опыт 1		
Спонтанная	2,02 1,60–2,34	2,18 2,05–2,23
LPS-стимулированная	7,84 6,99–8,90	6,90 6,42–7,25
Индекс стимуляции	3,0 2,0–4,6	2,1 2,0–2,2
Опыт 2		
Спонтанная	2,19 2,12–2,33	2,28 2,15–2,62
LPS-стимулированная	6,0 6,22–7,27	6,07 5,53–6,84
Индекс стимуляции	2,0 1,9 – 2,1	1,6 1,2–2,0
Среднее по двум опытам		
Спонтанная	2,10 1,60–2,34	2,23 2,05–2,62
LPS-стимулированная	7,22 6,22–8,90	6,48 5,53–7,25
Индекс стимуляции	2,5 1,9–4,6	1,8 1,2–2,2

Заключение

Таким образом, в использованной дозе при изученной схеме введения препарат «Лаоджан» стимулирует гуморальное и подавляет клеточное звено иммунного ответа на Т-зависимый антиген, не влияя на иммунную память. Изучение механизмов его действия показало, что многократное введение препарата в течение длительного времени снижает спонтанную пролиферацию как Т-, так и В-клеток. Несмотря на снижение спонтанной пролиферации, функциональная активность Т- и В-лимфоцитов, оцениваемая по митоген-индуцированной пролиферации, остается на высоком уровне. Спонтанная и LPS-индуцированная продукция иммуноглобулинов изменяется в противоположных направлениях: спонтанная обнаруживает тенденцию к возрастанию (на 6,2%), тогда как индуцированная несколько снижается (на 10,2%). Таким образом, наблюдаются про-

тивоположно направленные изменения индексов стимуляции в отношении пролиферативных и дифференцировочных реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Антитела. Методы.** / Под редакцией Д. Кэйти. В 2-х книгах. Книга 2. — М.: Мир, 1991. — 384 с.
2. Гублер Е.В., **Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов.** Ленинград: «Медицина». — 1978. — 296 с.
3. Cunningham A. **A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells.** // Nature. — 1965. — Vol. 207. — P. 1106–1107.
4. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., Nomoto K., Takeya T. **Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice.** // Immunology. — 1979. — Vol. 8, № 3. — P. 577–583.

Поступила в редакцию 23.05.2005