

УДК 615.37:[615.324:596.2].08

Т.И. Пономарева, Ю.И. Добряков

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690021 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43)

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУННЫХ СВОЙСТВ ХАУРАНТИНА ПРИ ИММУНОСУПРЕССИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ключевые слова: иммуносупрессия, лимфоциты, хаурантин.

В опытах на мышах-гибридах F1(CBA×C57BL/6) исследовали иммуотропное действие хаурантина — экстракта из морского гидробионта — по способности влиять на иммунный ответ у интактных животных и при иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном. Показано, что хаурантин при введении интактным мышам проявляет иммуностимулирующую и иммунокорректирующую активность, которая реализуется через Т-клеточное звено иммунитета. При моделировании иммунодепрессии хаурантин не влиял на антителообразование в ранние сроки после введения цитостатика (через 24 часа) и достоверно повышал в селезенке мышей уровень антителообразующих и розеткообразующих клеток в период активного восстановления антителообразования (через 9 суток). Предполагается, что одним из механизмов иммуностимулирующего действия хаурантина может служить его известная интерферогенная активность.

Иммунная система, как один из ведущих элементов гомеостаза, обеспечивает саморегуляцию и нормальную жизнедеятельность организма. Исследования последних лет показали, что любой патологический процесс в организме сопровождается изменениями в иммунной системе, глубина которых обусловлена интенсивностью воздействия [9, 14]. В связи с увеличением психологической нагрузки и неизбежным воздействием на организм человека возрастающего потока физических, химических и биологических воздействий окружающей среды иммунозависимые заболевания и состояния получают все большее распространение в популяции. Повышенный риск возникновения иммунодефицитных состояний служит основанием для поиска и применения препаратов, регулирующих иммунные процессы. В последние годы пришло понимание необходимости расширения сырьевой базы для получения лекарственных препаратов за счет богатейшего разнообразия флоры и фауны моря. Экстракт из морского гидробионта асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*) хаурантин (патент RU № 1522487, ТУ 9169-007-20783642-96, свидетельство на товарный знак № 236689) — комплекс биологически активных веществ, основными структурными компонентами которого являются фосфолипиды, свободные аминокислоты и полиненасыщенные жирные кислоты семейства омега-3 [5]. Многокомпонентный состав хаурантина обеспечивает широкий спектр его фармакологической активности, включающей и регулирующее влияние на многочисленные нарушения гомеостаза [1, 2]. При испытании радиопротекторных свойств было выяв-

лено, что хаурантин стимулирует пролиферативные процессы в кроветворной ткани, действуя преимущественно на клетки, участвующие в иммунной защите организма — нейтрофилы и лимфоциты [10]. Наличие миелосупрессирующего или миелостимулирующего эффектов служит основанием для исследования иммуотропной активности препарата [7, 12], что и явилось целью настоящей работы.

Материал и методы. Исследования проводили на мышах-гибридах F1(CBA×C57BL/6) — 100 особей массой по 18–20 г. Опыты выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского Сообщества (86/609/ЕС). Анализировали влияние хаурантина на развитие иммунного ответа у интактных животных и при медикаментозной иммуносупрессии у мышей, обработанных циклофосфаном (ЦФ) — 200 мг/кг внутрибрюшинно. В первом случае животных иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ) — 2×10^7 клеток на мышь внутрибрюшинно. В течение последующих 6 суток внутрижелудочно вводили хаурантин по 0,4 мл/кг (из расчета 28 мг/кг сухого остатка). Контрольные животные получали ежедневно в том же объеме дистиллированную воду. При моделировании иммуносупрессии мышей иммунизировали ЭБ на следующий день или через 9 суток после введения ЦФ. Хаурантин вводили внутрижелудочно ежедневно в течение всего эксперимента, начиная со дня иммунизации. Исследование клеточного звена иммунитета включало определение популяций и субпопуляций лимфоцитов периферической крови в реакции розеткообразования [3]. О величине гуморального иммунного ответа судили по количеству антителообразующих и розеткообразующих клеток (АОК и РОК) к ЭБ в селезенке и титрам антител к ЭБ в сыворотке крови мышей [3]. Результаты титрования выражали в $\log_2$ обратных титров антител. Величина индекса более 1,0 свидетельствовала об иммунизации. Животных выводили из эксперимента методом декапитации под легким эфирным наркозом. Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрического t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Шестидневное введение хаурантина интактным мышам (контроль) вызывало достоверное увеличение общего количества лейкоцитов периферической крови и изменение соотношения их морфологических форм. Также значимо была увеличена численность субпопуляции Т-лимфоцитов-хелперов. Введение хаурантина иммунизированным животным приводило к существенному снижению субпопуляции Т-лимфоцитов, повышенной

Таблица 1

Влияние хаурантина на показатели иммунокомпетентных клеток мышей-гибридов CBA×C57BL/6

Клетки, 10 ⁶ /мл	Условия опыта			
	контроль	хаурантин	ЭБ	ЭБ + хаурантин
Лейкоциты	8,12±1,29	10,19±2,17 ¹	10,76±2,14 ¹	9,19±1,70
Нейтрофилы	2,13±0,20	2,67±0,21 ¹	2,18±0,16	1,82±0,10 ²
Моноциты	0,26±0,07	0,56±0,07 ¹	0,90±0,06 ¹	0,55±0,06 ²
Лимфоциты	5,15±0,37	6,518±0,62 ¹	7,48±0,35 ¹	6,39±0,41
Т-лимфоциты	1,57±0,11	1,46±0,14	3,09±0,31 ¹	2,08±0,30 ²
Т-хелперы	0,44±0,03	0,67±0,04 ¹	1,32±0,20 ¹	0,876±0,11 ²
Т-супрессоры	0,16±0,06	0,16±0,07	0,23±0,08 ¹	0,21±0,09
В-лимфоциты	1,30±0,20	1,47±0,43	1,49±0,11	1,69±0,23

¹ Разница с контролем статистически значима.² Разница с группой «ЭБ» статистически значима.

Таблица 2

Влияние хаурантина на антителообразование мышей CBA×C57BL/6, обработанных ЦФ

Условия опыта	Кол-во АОК, тыс./орган	Кол-во РОК, тыс./орган	log ₂ титра антител к ЭБ
Контроль	25,8±2,4	350,0±14,0	5,5±0,2
ЭБ + хаурантин	44,0±4,2 ¹	430,0±10,3 ¹	5,8±0,2
ЦФ + ЭБ через 1 сут.	1,1±0,2 ¹	12,3±1,41	1,0±0,1 ¹
ЦФ + ЭБ и хаурантин через 1 сут.	1,0±0,2 ¹	14,1±1,81	1,0±0,1 ¹
ЦФ + ЭБ через 9 сут.	11,7±0,8 ^{1,2}	62,3±4,7 ^{1,2}	2,8±0,1 ^{1,2}
ЦФ + ЭБ и хаурантин через 9 сут.	24,1±0,8 ^{3,4}	146,5±10,2 ^{1,3,4}	4,3±0,3 ^{3,4}

¹ Разница с контролем статистически значима.² Разница с группой «ЦФ + ЭБ через 1 сут.» статистически значима.³ Разница с группой «ЦФ + ЭБ и хаурантин через 1 сут.» статистически значима.⁴ Разница с группой «ЦФ + ЭБ через 9 сут.» статистически значима.

антигенной стимуляции и достоверному (в 1,5 раза) снижению числа Т-хелперных лимфоцитов (табл. 1).

Введение хаурантина необработанным ЦФ иммунизированным мышам достоверно стимулировало антителообразование и увеличение количества иммунных клеток в селезенке мышей. При иммунизации животных на следующий день после введения ЦФ наблюдалось практически полное подавление антитело- и розеткообразования в селезенке (до 4 и 3,5% соответственно от иммунизированного контроля). Введение хаурантина в этих условиях не оказывало влияния на исследуемые показатели. Иммунизация же через 9 суток после обработки ЦФ значимо увеличивала количество АОК (в 11 раз) и РОК (в 5 раз) в селезенке, а также титры антител к ЭБ в сыворотке крови мышей. Применение хаурантина в данных условиях приводило к количеству АОК и титры антител к уровню иммунизированного контроля, количество РОК также значительно возрастало, однако не достигало значений контрольных животных (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Одной из основных индикаторных систем при скрининге иммуноотропных соединений или при изучении иммуноотропности лекарственных веществ является система иммунного ответа (первичного, вторичного) на гетерогенные эритроциты, обычно ЭБ. Показано, что на различные химические вещества, в том числе и лекарственные, в условиях *in vitro* и *in vivo*, развивает-

ся иммунная реакция, которая на клеточном уровне проявляется ростом числа антигенраспознающих и антигенпродуцирующих лимфоцитов и их бластных форм, а на гуморальном — увеличением титра антител, специфичных вводимым веществам и эндобиотикам [8, 9, 13, 15]. Интактные животные отреагировали на 6-дневное введение хаурантина как увеличением общего количества лейкоцитов и их морфологических форм, так и достоверным увеличением числа иммунокомпетентных клеток. Внутри популяции лимфоцитов наиболее существенным изменениям подверглась популяция Т-клеток, выполняющих хелперную функцию, вследствие этого при неизменном количестве Т-супрессоров значимо увеличился иммунорегуляторный индекс (Т-хелперы/Т-супрессоры). Введение хаурантина иммунизированным животным приводило к достоверному снижению субпопуляции Т-лимфоцитов и, что очень важно, к снижению (в 1,5 раза) числа Т-хелперов. И хотя сохранялся довольно высокий уровень этой субпопуляции в периферической крови, иммунорегуляторный индекс приближался к физиологической норме. Менее всего были подвержены действию хаурантина Т-лимфоциты с супрессорной активностью: на фоне иммунизации их количество снизилось на 10%. Вместе с тем повышенные иммунизацией титры антител к эритроцитам барана (log₂ 5,3) в сыворотке крови мышей сохранялись на высоком уровне и в группе с хаурантином

(данные не приводятся). Представленные результаты свидетельствуют о возможности коррекции хаурантином нарушенного равновесия в соотношении иммунорегуляторных клеток.

Динамика восстановления тимусзависимого иммунного ответа при медикаментозной иммуносупрессии свидетельствует о том, что эффективность действия хаурантина зависит от времени иммунизации, прошедшего с момента введения цитостатика. Хаурантин не влиял на антителообразование в ранние сроки после введения ЦФ и повышал уровень АОК до уровня иммунизированного контроля в период активного восстановления антителообразования. Ранее нами было показано, что хаурантин стимулирует репаративные процессы в кроветворных органах при радиационном поражении [10]. Известна также способность хаурантина влиять на метаболические процессы при нарушенных функциях организма [6]. Отсутствие эффекта хаурантина в первые сутки после обработки животных ЦФ, по-видимому, обусловлено серьезными нарушениями в иммунной системе, возникающими непосредственно после повреждающего действия цитостатика и характеризующимися массовой гибелью лимфоцитов и нарушением функций выживших лимфоцитов, включая их способность к кооперативному взаимодействию и рециркуляции [12, 13]. Одним из возможных механизмов стимулирующего действия хаурантина на иммунореактивность организма может быть его интерферогенная активность [4].

Таким образом, представленные, а также полученные нами ранее результаты [11], свидетельствуют о наличии у хаурантина иммунокорректирующей и иммуномодулирующей активности, которая реализуется через Т-клеточное звено иммунной системы. Хаурантин является уникальным препаратом, представляющим собой сложную композицию природных веществ, биологические свойства которых могут дополнять друг друга. В частности, если фосфолипиды рассматривать в качестве субстратов для модификации и репарации клеточных мембран (это предположение подтверждено работами Добрякова Е.Ю. [2] и Кушнеровой Н.Ф. [6]), то аминокислоты могут быть охарактеризованы как стимуляторы регенерации, а каротиноиды и витамин С — как антиоксиданты. Представленные данные предполагают дальнейшее более углубленное исследование иммунных свойств хаурантина.

Выводы

1. Хаурантин в системе *in vivo* проявляет иммунокорректирующее и иммуномодулирующее действие.
2. Иммунокорректирующая активность хаурантина реализуется через стимуляцию популяции Т-лимфоцитов, в частности, Т-хелперных клеток.

Литература

1. Добряков Ю.И., Добряков Е.Ю., Пономарева Т.И. Исследование фармакологических свойств экстракта из морского гидробионта — асцидии пурпурной (*Halosynthia*

- aurantium*) // Дальневосточные моря России. Т. 2. М.: Наука, 2007. С. 637–659.
2. Добряков Е.Ю. Фармакологические эффекты экстракта из туники асцидии *Halosynthia aurantium*: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2004. 147 с.
3. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 472 с.
4. Купин В.И. Элеутерококк и другие биологически активные модификаторы в онкологии. М.: Медэкспорт, [Б.Г.]. 40 с.
5. Кушнерова Н.Ф., Добряков Ю.И., Янькова В.И. Химический состав спиртовых извлечений из туники асцидии пурпурной *Halosynthia aurantium* // Валеология: Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья. Вып. 4. Владивосток: Дальнаука, 2000. С. 151–155.
6. Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Лесникова Л.Н. Коррекция стрессовых нарушений метаболизма экстрактом из туники асцидии (*Halosynthia aurantium*) // Дальневосточные моря России. Т. 2. М.: Наука, 2007. С. 671–682.
7. Михайлова А.А., Миелопептиды и их роль в функционировании иммунной системы // Иммунология. 2001. № 5. С. 16–18.
8. Нел А.И. Активация Т-лимфоцитов, опосредованная рецептором антигена // Аллергология и иммунология. 2005. Т. 6, № 3. С. 15–28.
9. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. М.: Медицина, 1996. 248 с.
10. Пономарева Т.И. Изучение радиомодифицирующего эффекта препаратов природного происхождения // Валеология: Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья. Вып. 3. Владивосток: Дальнаука, 1996. С. 112–115.
11. Пономарева Т.И., Добряков Ю.И. Влияние хаурантина на некоторые иммунологические показатели стрессированных крыс // Нейроиммунология. 2007. Т. 5, № 2. С. 93–95.
12. Сакаева Д.Д., Лазарева Д.Н. Влияние гентамицина на иммунитет при иммунодефиците и действии иммуномодуляторов // Экспер. и клин. фармакол. 1998. Т. 61, № 3. С. 50–53.
13. Clements J.L., Boerth N.J., Lee J.R., et al. Integration of T-cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins // Annu. Rev. Immunol. 1999. Vol. 17. P. 89–108.
14. Padgett D.A., Glaser R. How stress influences the immune response // Trends Immunol. 2003. Vol. 24. P. 444–448.
15. Van Oers N.S. T cell receptor-mediated signals and signals governing T cell development // Semin. Immunol. 1999. Vol. 11. P. 227–237.

Поступила в редакцию 07.04.2009.

EXPERIMENTAL STUDY OF HAURANTIN IMMUNE PROPERTIES IN CASE OF IMMUNOSUPPRESSION

T.I. Ponomareva, Yu.I. Dobryakov

V.I. Ilichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russia)

Summary — The F1 (1CBA X C57BL/6) hybrid mice experiments allowed to study immune-response modulating effect produced by marine hydrobiont-derived haurantin. This substance appeared to have capability of giving immune response in intact animals and under immunosuppression caused by cyclophosphan. As reported, when introducing into intact mice, haurantin tended to exhibit immune-response modulating and immunocorrecting activities to be seen via T-cell component of the immune system. In vitro immunosuppression simulation showed that haurantin has had no effects on the antibody formation immediately after injecting cytostatic agent (in 24 hours) but for certain induced the level of antibody-forming and rosette-forming cells in mice spleen during the period of active restoration of the antibody formation (in 9 days). The well-known interferon-inducing activities can be deemed as one of the immunomodulation mechanisms caused by haurantin.

Key words: immunosuppression, lymphocytes, haurantin.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 49–51.