

ВЫРАЖЕННОСТЬ ИММУНОКОРРИГИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФЕНОТРОПИЛА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ОТНОСИТЕЛЬНО ИНДУКЦИИ ИММУНОСУПРЕССИИ

Самотруева М.А.^{1,3}, Тюренков И.Н.², Теплый Д.Л.³,
Лужнова С.А.⁴, Магомедов М.М.¹

¹ Астраханской государственной медицинской академии, кафедра фармакологии, г. Астрахань

² Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии
и биофармации ФУВ, г. Волгоград

³ Астраханский государственный университет, кафедра физиологии и морфологии человека
и животных, г. Астрахань

⁴ ФГУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры Росздрава», отдел иммунологии
и биохимии, г. Астрахань

Резюме. В работе на мышах линии СВА изучено иммунокорригирующее действие фенотропила (трехкратное внутрибрюшинное введение в дозе 50 мг/кг) при применении до антигенного воздействия и/или индукции циклофосфамидной иммунодепрессии, а также в условиях развивающейся иммунной недостаточности. Установлено, что фенотропил способен предотвращать развитие иммунной патологии, проявляющейся подавлением активности всех звеньев иммуногенеза, что свидетельствует о профилактической направленности его иммунокорригирующих свойств.

Ключевые слова: иммунодепрессия, циклофосфамид, фенотропил, иммунокоррекция.

Samotrueva M.A., Tyurenkov I.N., Teply D.L., Luzhnova S.A., Magomedov M.M.

EXPRESSION OF IMMUNOCORRECTIVE EFFECTS OF PHENOTROPIL AT DIFFERENT TERMS OF INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

Abstract. In present work, an immunocorrective effect of phenotropil after intraperitoneal injection (50 mg/kgx3) was studied in CBA mice. The drug was administered either before antigenic stimulation, and/or cyclophosphamide-induced immunosuppression, or at the terms of evolving immune deficiency. Phenotropil was shown to prevent the development of immune pathology which manifested as inhibition at all steps of immunogenesis, thus suggesting a preventive potential of its immunocorrective properties. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 6, pp 567-570)

Введение

Причинная взаимосвязь многих заболеваний нервной системы с нарушениями генерализованной иммунорегуляции в последние годы стала объектом экспериментальной отработки новых лечебно-профилактических подходов, в частности

подходов к нейроиммунной фармакокоррекции посредством препаратов, проявляющих психо- и иммунокорригирующие свойства [4, 6, 8, 9, 10].

За последние десятилетия прочные позиции среди нейропсихоиммунотропных препаратов заняла группа ноотропов. Фенотропил, являющийся одним из препаратов нового поколения, выгодно отличается от других средств этой группы выраженностью основного эффекта и спектром дополнительных фармакологических свойств [2, 3, 5].

Принимая во внимание выше сказанное, и учитывая проведенные нами ранее исследования

Адрес для переписки:

Самотруева Мария Александровна,
414000, г. Астрахань, ул. Гилянская, 50.
Тел.: (960) 865-11-78.
E-mail: ms1506@mail.ru

по изучению иммунокорректирующих свойств фенотропила в аспекте «доза – эффект», считаем актуальным дальнейшее изучение степени выраженности иммунокоррекции посредством фенотропила при применении его в различные сроки относительно индукции иммунологической недостаточности.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 120 мышах линии СВА обоего пола 3 мес. возраста (масса 19–25 г), полученных из питомника филиала «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми «Международной конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986). Экспериментальное моделирование иммунологической недостаточности проводили классическим методом – путем интраперитонеально введения циклофосфида («Деко», Россия) в дозе 100 мг/кг. Изучали степень формирования клеточной и гуморальной реакции иммунного ответа, а также выраженность фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.

Выполнено 2 серии экспериментов на 120 мышах линии СВА обоего пола, массой 19–25 г. В 1 серии изучалось влияние фенотропила при трехкратном внутрибрюшинном введении раз в день в течение 3 дней в дозе 50 мг/кг за 3 дня до иммунизации и индукции иммунодепрессии. Во 2-й изучалось влияния фенотропила при трехкратном внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг через 3 дня после иммунизации и индукции иммунодепрессии.

Экспериментальные животные были разделены на следующие группы: 1) контрольная группа № 1 – интактные животные; 2) контрольная группа № 2 – животные с моделью иммуносупрессии; 3) опытная группа – мыши с моделью иммуносупрессии, которым с профилактической целью внутрибрюшинно в течение 3 дней (1 раз в сутки) вводили фенотропил в дозе 50 мг/кг (см. 1-ю серию экспериментов); и 4) также опытная группа – мыши с моделью иммуносупрессии, которым с лечебной целью внутрибрюшинно в течение 3 дней (1 раз в сутки) вводили фенотропил в дозе 50 мг/кг (см. 2-ю серию экспериментов).

Изучение влияния фенотропила на клеточное звено первичного иммунного ответа на эритроциты барана (ЭБ) в условиях иммунологической недостаточности проводили на модели реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) [7]. Иммунизацию животных всех групп проводили однократно подкожно 1×10^7 ЭБ в объеме 100 мкл. Для выявления сенсибилизации на 5 сутки вводили разрешающую дозу антигена 1×10^8 ЭБ в объеме 20 мкл под апоневротическую пластинку правой задней конечности («опытная» лапка), в контро-

теральную лапку вводили соответственно 20 мкл физиологического раствора («контрольная» лапка). Учет интенсивности местной реакции проводили через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена. После выведения животных из опыта отрезали обе задние лапки на уровне голеностопного сустава, взвешивали на торсионных весах, подсчитывали индекс реакции ГЗТ (ИР) по формуле: $ИР = (M_0 - M_k) / M_k \times 100\%$, где M_0 – масса «опытной» лапы, M_k – масса «контрольной» лапы.

Изучение влияния фенотропила на гуморальное звено первичного иммунного ответа на эритроциты барана (ЭБ) в условиях иммунологической недостаточности проводили на основе реакции прямой гемагглютинации (РПГА) [7]. Иммунизацию проводили однократно внутрибрюшинно 5×10^8 ЭБ в объеме 100 мкл. Через 7 дней после иммунизации животных выводили из эксперимента с использованием хлороформа, получали сыворотку. Для инактивации комплемента сыворотку прогревали при $t = 56$ °C в течение 30 мин. РПГА для подавления неспецифического связывания антител проводили в 50 мкл 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумин (Sigma), в которой последовательно двукратно разводили исследуемые сыворотки, с добавлением 25 мкл 1% взвеси ЭБ. Предварительный учет результатов РПГА производили через 1 час инкубации при $t = 37$ °C, реакцию учитывали окончательно через 18 часов ($t = +4$ °C). Титр антител выражали в среднегеометрических показателях.

В качестве источника нейтрофилов использована гепаринизированная кровь мышей линии СВА. После центрифугирования 0,5 мл крови (1500 об/мин, 5 мин), к осадку крови добавляли 1 мл 1% раствора желатина, приготовленного на среде 199. Через 30 мин инкубации при $t = 37$ °C производили забор надосадочного слоя, состоящего из клеток белой крови, к которому добавляли 2–3 мл среды 199 и центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин). Надосадочную жидкость сливали, а к осадку добавляли 0,5 мл среды 199. Полученную взвесь лейкоцитов использовали для постановки реакции фагоцитоза. В качестве тест-объекта использовали меланово-формальдегидные латексы размером 1,5–2 мкм («МинМедБиопром», Россия). Латекс предварительно трехкратно отмывали физраствором (3000 об/мин, 20 мин) и ресуспендировали в среде 199. Число латексных частиц доводили средой 199 до 75 тыс./мкл. В центрифужной пробирке смешивали 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл взвеси частиц латекса. После инкубации смеси ($t = 37$ °C, 30 мин), сделанные мазки фиксировали в этаноле и окрашивали по Романовскому–Гимзе. О фагоцитарной активности нейтрофилов судили по следующим показателям: фагоцитарный индекс или % фагоцитоза (количество нейтрофилов с латексом из 100); фагоцитарное число (кол-во частиц латекса/100).

В 1-й серии выведение мышей из эксперимента осуществляли через сутки после индукции иммунодепрессии циклофосфамидом, во 2-й — через сутки после последнего введения фенотропила.

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Для определения вероятных изменений между показателями опытных и контрольных животных использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При моделировании иммунологической недостаточности у мышей линии СВА (2-я контрольная группа) наблюдалось снижение индекса РГЗТ более чем на 30% ($p < 0,05$), подавление выработки антиэритроцитарных антител более чем на 50% ($p < 0,001$), а также снижение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови

более чем на 20% ($p < 0,05$) по сравнению с показателями в контрольной группе № 1 (рис. 1).

Результаты изучения иммунокорректирующих свойств фенотропила при трехкратном внутривентральном введении в дозе 50 мг/кг до антигенной стимуляции и/или индукции иммунодепрессии, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о способности препарата предотвращать спровоцированные циклофосфамидом нарушения в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета, а также фагоцитарной активности нейтрофилов. Как видно из рис. 1а и 1б, индекс РГЗТ и уровень антиэритроцитарных антител у животных опытной группы, превышая соответствующие показатели в контроле № 2 более чем на 50% (от $p < 0,05$), приближаются к параметрам иммунного ответа животных контрольной группы № 1 ($p > 0,05$). Количество клеток, участвующих в неспецифической защите организма (фагоцитарный индекс) ($p < 0,05$) и интенсив-

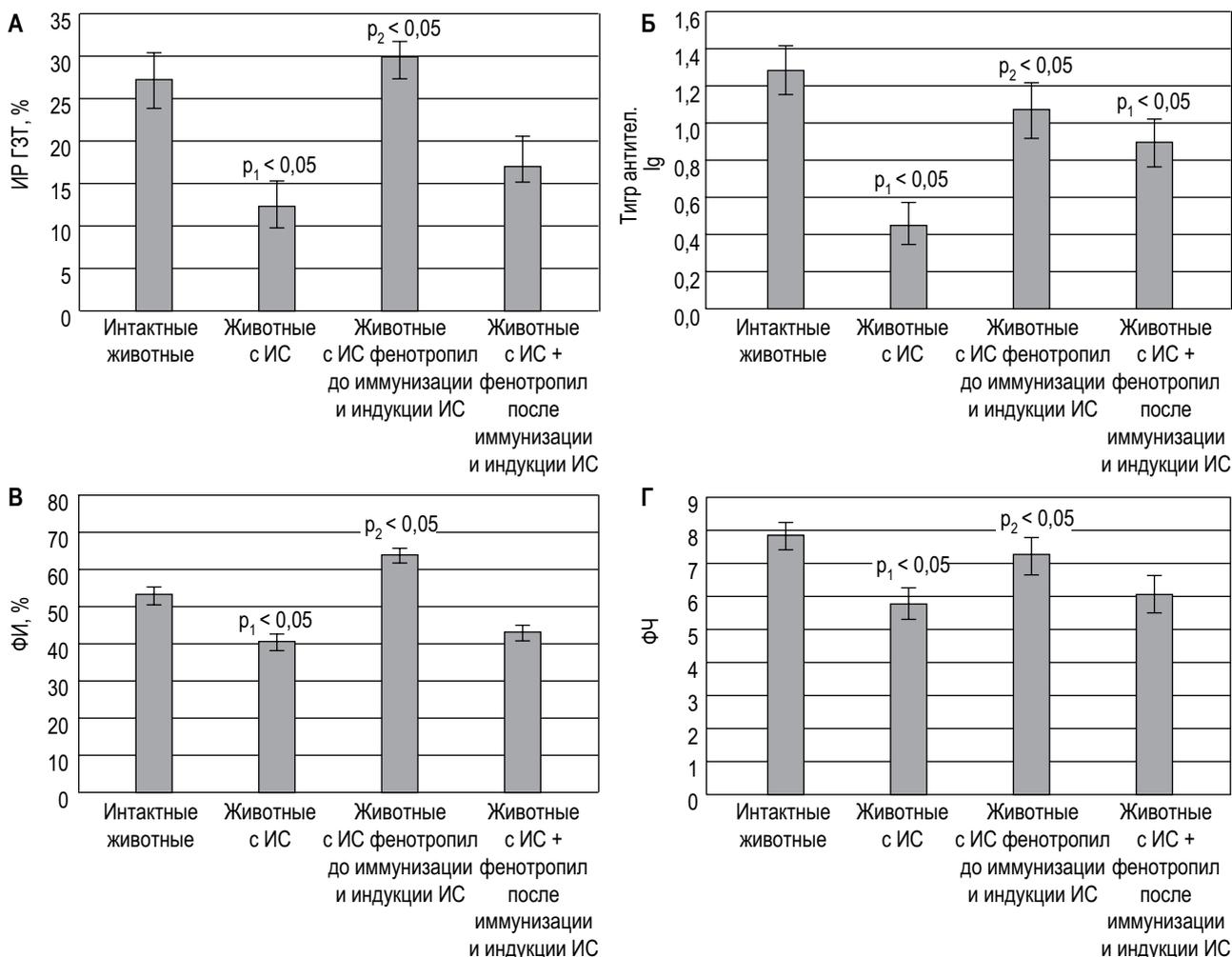


Рисунок 1. Влияние фенотропила на формирование РГЗТ (А), РПА (Б) и фагоцитарную активность (В, Г) нейтрофилов при применении в различные сроки относительно иммунизации и индукции иммуносупрессии

Примечание. p_1 и p_2 — степень достоверности соответственно относительно группы интактных животных и животных с иммуносупрессией; ИР ГЗТ — индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа, ФИ — фагоцитарный индекс, ФЧ — фагоцитарное число, ИС — иммуносупрессия.

ность фагоцитоза (фагоцитарное число) ($p < 0,05$) у животных, получавших фенотропил до индукции иммунодепрессии, также восстанавливается, практически достигая показателей «нормы» в контроле № 1 ($p > 0,05$) (рис. 1в и 1г).

Эксперименты по изучению иммунокорригирующих свойств фенотропила в условиях сформированной иммунологической недостаточности показали, что введение препарата после иммунизации и/или индукции иммунодепрессии способствует восстановлению лишь гуморального звена иммуногенеза, при этом уровень сывороточных антител у опытных животных увеличивается в сравнении с показателями иммунодепрессированных животных контрольной группы № 2 более чем на 60% ($p < 0,05$) (рис. 1б). Восстановления клеточного звена и фагоцитарной активности нейтрофилов под влиянием фенотропила, введенного при формировании иммунологической недостаточности, не наблюдается: индекс РГЗТ, % фагоцитоза и фагоцитарное число сохраняются на уровне значений, характерных для животных с иммуносупрессией ($p > 0,05$) (рис. 1а, 1в, 1г).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что лечебный эффект фенотропила в условиях сформированной иммуносупрессии проявляется лишь в отношении гуморального звена иммунной реактивности. Введение же препарата до антигенной стимуляции и/или индукции иммунодепрессии позволяет предотвратить развитие иммунологической недостаточности, проявляющейся подавлением активности всех звеньев иммуногенеза, что показывает на наличие у фенотропила профилактической направленности иммунокорригирующих свойств.

Список литературы

1. Аркадьев В.Г., Макаренко А.Н., Миронюк Ю.М., Герасимова Н.Г. Экспериментальное воспроизведение средней и тяжелой степени им-

мунодепрессии при использовании циклофосфана // Вестник КНУ. — 2003. — Т. 39. — С. 51-52.

2. Ахапкина В.И., Воронина Т.А. Спектр фармакологических эффектов фенотропила // Фарматека. — 2005. — № 13. — С. 19-25.

3. Белоусов Ю.Б., Мухина М.А. Фенотропил — ноотропный препарат нового поколения // Качественная клиническая практика. — 2005. — № 3. — С. 1-12.

4. Ветлугина Т.П., Семке В.Я. Клиническая психонейроиммунология на современном этапе // Сибирской вестник психиатрии и наркологии. — 2003. — № 1. — С. 34-36.

5. Герасимова М.М., Чичановская А.В., Слезкина А.А. Клинико-иммунологические аспекты влияния фенотропила на последствия церебрального инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2005. — № 5. — С. 63-64.

6. Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.Е. Регуляторная метасистема (нейроиммуноэндокринная регуляция гомеостаза). — М.: Медицина, 2002. — 168 с.

7. Хайтов Р.М., Гушин И.С., Пинегин Б.В., Зебров А.И. Методические указания по изучению иммунотропной активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ — М., 2005. — С. 501-514.

8. Fleshner M., Laudenslager M.L. Psychoneuroimmunology: then and now // Behav. Cogn. Neurosci Rev. — 2004. — № 2. — P. 114-130.

9. Mausch K. Main issues of psychoneuroimmunology // Psychiatr Pol. — 2000. — № 3. — P. 381-388.

10. Sali A. Psychoneuroimmunology. Fact or fiction? // Aust Fam Physician. — 1997. — № 11. — P. 1291-1294.

поступила в редакцию 07.04.2009

отправлена на доработку 22.04.2009

принята к печати 18.06.2009