



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

ФИТОПРЕПАРАТЫ МЕТОСЕПТ, ВИТАНОРМ, МАКСИФАМ И БАКТРУМ В РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ЦИТОКИНОВ ВОСПАЛЕНИЯ

УДК 615.03

¹Аксенова В. И.: директор;

²Шарипова М. М.: ассистент кафедры рефлекторной и мануальной терапии, к.м.н.;

³Мельникова В. И.: старший научный сотрудник, к.б.н.;

³Воронова С. Н.: научный сотрудник, к.б.н.;

⁴Василенко А. М.: главный научный сотрудник, д.м.н., профессор.

¹Научно-производственная компания ООО «ОПТИСАЛТ»

²ГОУ ВПО Московский Государственный Медико-Стоматологический Университет, г. Москва, Россия

³ФБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва, Россия

⁴ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии», г. Москва, Россия

Введение

Как было нами показано, комплексное применение растительных препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум вызывает подавление гуморального иммунитета, в частности, антителообразования не только в высоких, но и в низких дозах. Известно, что между гуморальным и клеточным иммунитетом существуют конкурентные взаимоотношения, которые сопровождаются изменением соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов, продуцирующих соответствующие цитокины [1]. В результате активации цитокиновой сети развивается цепь событий, вовлекающих в процесс и другие клетки иммунной системы. Для активации иммунной системы в лабораторных исследованиях часто применяют бактериальные эндотоксины, липополисахариды (ЛПС), являющиеся основными компонентами наружной мембраны грамотрицательных бактерий. ЛПС использовали еще в 50-х годах прошлого века для имитации всех стадий воспалительного процесса без заражения организма потенциально опасными бактериальными инфекциями. Под действием ЛПС клетки иммунной системы способны синтезировать цитокины воспаления, такие как интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-6, ИЛ-12, фактор некроза опухоли (ФНО α), белок хемотаксиса моноцитов (MCP-1), интерферон (ИНФ γ), а также противовоспалительный цитокин ИЛ-10 [2, 3].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния комплексного применения препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум на синтез про- и противовоспалительных цитокинов в норме и при воспалении, индуцированном ЛПС.

Материалы и методы

Животные. Исследования выполнены на самцах мышей линии СВА массой 18–20 г. Мышей содержали в стандартных условиях с контролируемым режимом

температуры (24 °С) и освещения (в течение 12 ч), со свободным доступом к воде и пище.

Препараты. В исследованиях использовали смесь препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум, состав которых был описан ранее [4,5].

Схема эксперимента. Суточную дозу препаратов (по 1-ой капсуле или таблетке каждого) смешивали и рассчитывали терапевтическую дозу на 1 кг веса, которая у мышей составляла 0,7 мг/мышь. Терапевтическую и десятикратно увеличенную (7мг/мышь) дозы разводили в 0,1 мл дистиллированной воды и ежедневно вводили мышам пипеткой перорально в течение 14 суток. Животные контрольных групп препараты не получали. Животные подопытных групп получали смесь препаратов в дозе 0,7 мг/мышь или в дозе 7 мг/мышь. Через 14 дней после приема препаратов одной из контрольных и подопытных групп животных внутрибрюшинно (в/б) вводили ЛПС *E. coli* (45 мкг/кг веса в 0.5 мл 0.9%-ного NaCl, pH 7.2). Доза ЛПС была выбрана нами как минимальная толерантная доза, вызывающая повышение температуры тела [6]. Уровень цитокинов: ИЛ-12, ИНФ γ , ИЛ-10, ФНО α , ИЛ-6 и MCP-1, оценивали в сыворотке крови неинфицированных и инфицированных ЛПС мышей при помощи проточной цитометрии через 1.5 и 3 часа после в/б введения ЛПС с использованием специфических антител к этим цитокинам. Каждая группа была представлена 8 животными. Статистическую обработку проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде среднего + стандартная ошибка.

Результаты и их обсуждение.

Одним из ключевых цитокинов, ответственных за реализацию Т-клеточного механизма защиты против бактериальной или паразитической инфекции, является провоспалительный цитокин ИЛ-12 [7]. Комплексное применение препаратов метосепт, витанорм, макси-

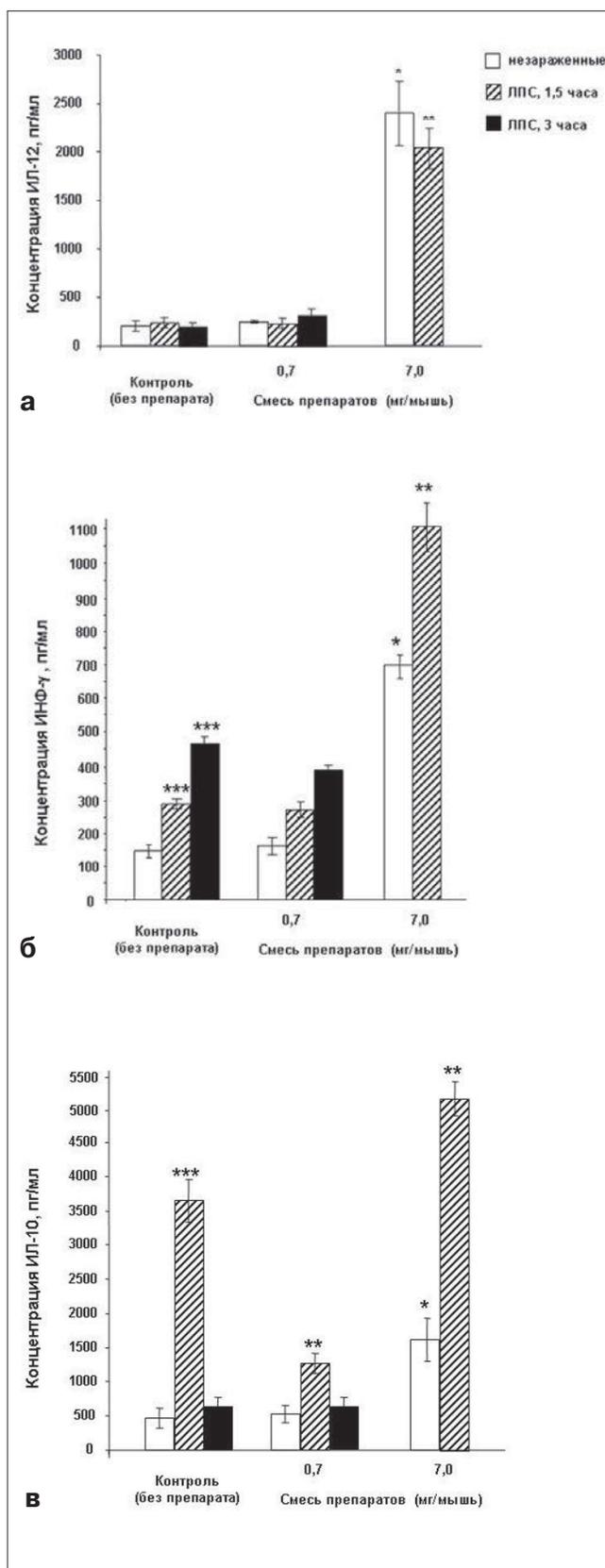


Рис. 1. Эффект комплексного применения фитопрепаратов на синтез цитокинов ИЛ-12 (а), ИЛ-10 (б) и ИЛ-10 (в).

Примечание: смесь препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрим в дозах 0,7 и 7,0 мг/мышь; * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой животных, не инфицированных бактериальным эндотоксином; ** $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили ЛПС. *** $p < 0.05$ по сравнению с животными, не инфицированными бактериальным эндотоксином; оценку уровня цитокинов проводили через 1,5 часа после введения ЛПС (заштрихованные столбики) и через 3 часа после введения ЛПС (черные столбики).

фам и бактрим в дозе 0,7 мг/мышь не влияло на продукцию ИЛ-12. Его уровень соответствовал уровню ИЛ-12 контрольной группы животных, не принимавших препараты (рис. 1а).

В то же время десятикратно увеличенная доза (7мг/мышь) стимулировала продукцию этого цитокина в 12 раз у не инфицированных бактериальным эндотоксином животных и в 10 раз у животных, которым вводили ЛПС.

ИЛ-12, в свою очередь, индуцирует синтез ИЛ-10, обладающего противовирусным, противопаразитарным и противоопухолевым действием [8]. ИЛ-10 повышает активность другого важного звена иммунной системы – естественных клеток-киллеров – основных участников врожденного иммунитета. Через 1,5–3,0 часа после введения ЛПС уровень ИЛ-10 увеличивался в 2–3 раза по сравнению с контрольными неинфицированными животными. Смесь препаратов в дозе 0, 7 мг мышь практически не изменяла его уровень по сравнению с контролем (рис. 1б). Препараты в дозе 7 мг/мышь стимулировали продукцию ИЛ-10 почти 5 раз у неинфицированных животных и в 4 раза после заражения ЛПС по сравнению с мышами, не принимавшими препараты.

Физиологическим ингибитором синтеза цитокинов клеточного иммунитета является ИЛ-10. Способность ИЛ-10 подавлять синтез таких цитокинов, как ИЛ-12, ИЛ-6, ФНО α связана с его способностью подавлять синтез ИЛ-12. Как правило, клетки иммунной системы продуцируют и секретируют сначала провоспалительные цитокины, в том числе ИЛ-12, а затем ИЛ-10, но с преобладанием ИЛ-12. Согласно нашим данным, при бактериальном инфицировании ЛПС уровень ИЛ-10 увеличивался в 7 раз через 1,5 часа после заражения, а смесь препаратов в дозе 0,7 мг/мышь снижала повышенный уровень этого цитокина почти в 3 раза (рис. 1в). Через 3 часа после бактериального заражения его уровень в крови падал до контрольного уровня. Десятикратно увеличенная доза препаратов (7 мг/мышь) усиливала продукцию ИЛ-10 в 3,5 раза у неинфицированных животных и в 1,5 раза после введения ЛПС по сравнению с контрольными животными, не получавшими препараты. Таким образом, синтез ИЛ-12 преобладает (увеличивается в 10–12 раз) над синтезом ИЛ-10 (увеличивается в 1,5–3,5 раза) после приема препаратов в высокой дозе. Известно, что длительное повышение уровня ИЛ-10 является плохим прогностическим признаком и вызывает снижение противоинфекционной защиты и развитие хронических инфекций [9]. Согласно нашим данным, уровень ИЛ-10 в периферической крови снижается до нормы уже через 3 часа после введения ЛПС.

ЛПС и ИЛ-10 являются основными индукторами синтеза еще одного цитокина ФНО α , выполняющего регуляторные и эффекторные функции в иммунном ответе и в период запуска воспаления [2, 10]. Аналогично с другими провоспалительными цитокинами, низкая доза смеси препаратов (0,7 мг/мышь) не влияла на синтез ФНО α ни в нормальных условиях, ни после активации иммунной системы ЛПС (рис. 2а). Его уровень не превышал уровня цитокина контрольных животных, не получавших препараты. Через 3 часа после введения ЛПС концентрация ФНО α в крови резко падала. Доза 7 мг/мышь стимулировала синтез ФНО α в 5 раз у неинфицированных животных и в 3 раза после индукции воспаления ЛПС, по

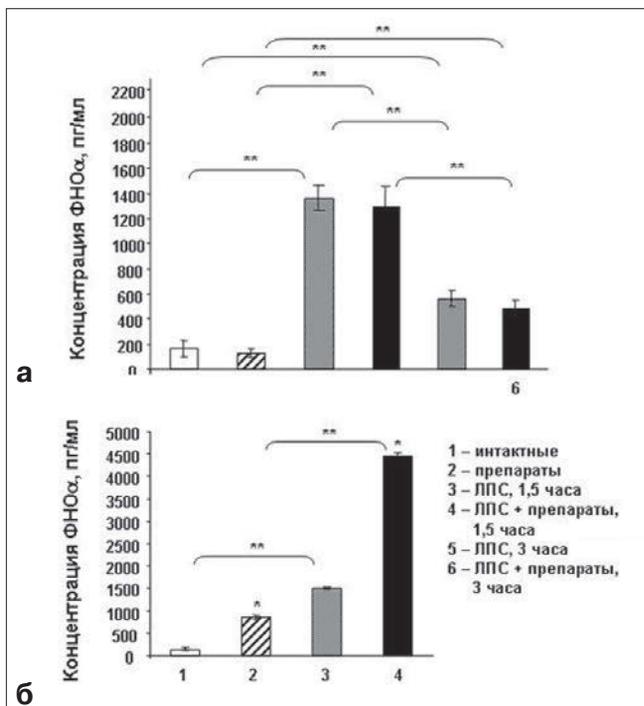


Рис. 2. Эффект комплексного применения фитопрепаратов на синтез провоспалительного цитокина ФНОα.

Примечание: смесь препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум в дозе 0,7 мг/мышь (а) и 7,0 мг/мышь (б); * $p < 0.05$ по сравнению с предыдущим столбиком; ** $p < 0.05$ между указанными столбиками. ЛПС, 1,5 часа или 3 часа – оценка уровня ФНОα через 1,5 или 3 часа после введения ЛПС.

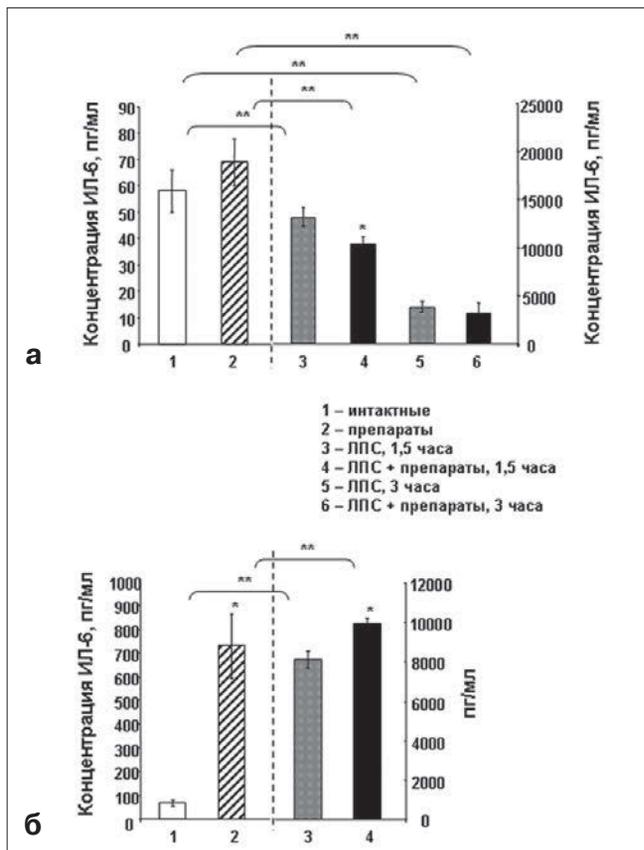


Рис. 3. Эффект комплексного применения фитопрепаратов на синтез провоспалительного цитокина ИЛ-6.

Примечание: смесь препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум в дозе 0,7 мг/мышь (а) и 7,0 мг/мышь (б); * $p < 0.05$ по сравнению с предыдущим столбиком; ** $p < 0.05$ между указанными столбиками; оценка уровня ФНОα через 1,5 или 3 часа после введения ЛПС.

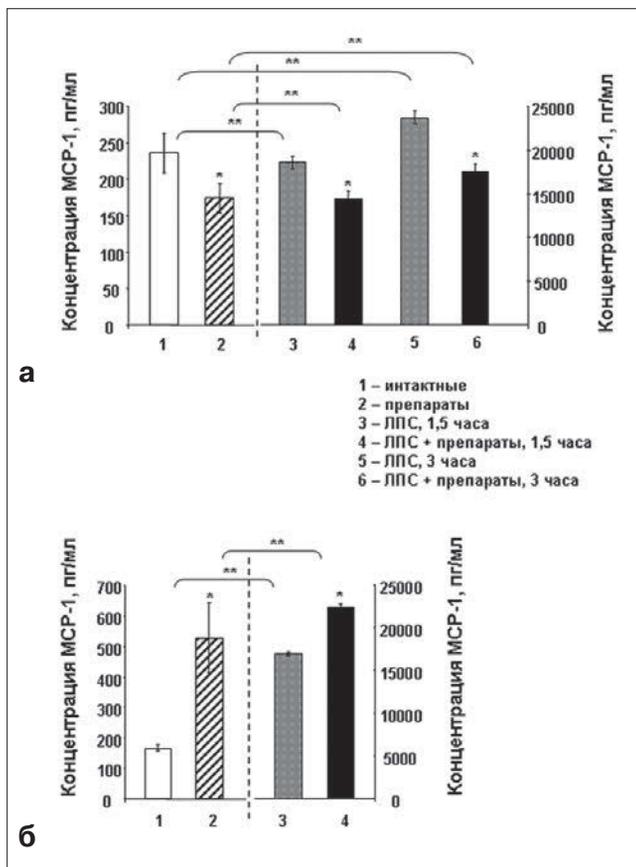


Рис. 4. Эффект комплексного применения фитопрепаратов на синтез провоспалительного цитокина МСР-1.

Примечание: смесь препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум в дозе 0,7 мг/мышь (а) и 7,0 мг/мышь (б); * $p < 0.05$ по сравнению с предыдущим столбиком; ** $p < 0.05$ между указанными столбиками; оценка уровня МСР-1 через 1,5 или 3 часа после введения ЛПС.

сравнению с животными, не получавшими препараты (рис. 2б). Следует отметить, что ФНОα. потенцирует, в свою очередь, синтез ИНФγ, ИЛ-10 и провоспалительного цитокина ИЛ-6 [11].

ИЛ-6 – является фактором дифференцировки В-лимфоцитов, способствуя их созреванию в антитело-продуцирующие клетки. Кроме того, ИЛ-6 индуцирует синтез белков острой фазы, в связи с чем также может быть отнесен к цитокинам воспаления [2].

Согласно нашим данным, исходный уровень ИЛ-6 был незначительным и не менялся под действием смеси препаратов в дозе 0,7 мг/мышь (рис. 3а). Его уровень увеличивался в 230 раз через 1,5 часа после введения ЛПС, а смесь препаратов в низкой дозе достоверно снижала это увеличение на 15%. Через 3 часа после введения ЛПС уровень ИЛ-6 значительно падал (в 3,5 раза) по сравнению уровнем, выявляемым через 1,5 часа. Синтез ИЛ-6 увеличивался в 10 раз после приема препаратов в дозе 7 мг/мышь (рис. 3б). После активации ЛПС под действием смеси препаратов его уровень увеличивался на 20% по сравнению с контрольной группой животных, получавших только ЛПС.

ИЛ-6, а также ФНОα, ИНФγ и ЛПС являются индукторами синтеза хемокина МСР-1, который необходим для активации нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и привлечения этих клеток в очаг воспаления [12]. Подобно ИЛ-6, исходный уровень МСР-1 был низким. После бактериального инфицирования мышей его

уровень увеличивался в 70 раз через 1,5 часа и в 100 раз через 3 часа после заражения ЛПС (рис.4а). Уровень МСР-1 незначительно снижался под действием смеси препаратов в дозе 0,7 мг/мышь. После приема препаратов в дозе 7 мг/мышь уровень МСР-1 увеличивался в крови в 3,5 раза у не инфицированных ЛПС животных и в 1,4 раза после введения ЛПС по сравнению с контрольными группами животных, не получавшими препараты.

Заключение

Таким образом, комплексное применение препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум оказыва-

ет дозо-зависимый модулирующий эффект на синтез и секрецию цитокинов воспаления противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в норме и после индукции воспаления бактериальным эндотоксином ЛПС. Под действием низкой дозы препаратов (0,7 мг/мышь) уровень цитокинов либо не изменяется, либо снижается, тогда как высокие дозы препаратов (7 мг/мышь) стимулируют их синтез и секрецию в кровь как у неинфицированных мышей, так и после введения ЛПС. Иммуотропная активность фитопрепаратов усиливает сопротивляемость организма к бактериальной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. ГЭОТАР-Медиа. – М., 210. – 752с.
2. Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: Actions and mechanisms of action // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79. – P. 1–71.
3. Liverman C.S., Kaftan H.A., Cui L. et al. Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection // *Neurosci. Lett.* – 2006. – Vol. 399. – P. 220–225.
4. Аксенова В.И., Шарипова М.М., Извольская М.С. и др. Репаративная регенерация тканей кожи крыс под действием растительных препаратов метосепт и витанорм // *Вестник восстановительной медицины.* – 2011. – № 3. – С. 21-24.
5. Паразиты – против человека. Кто победит? ООО «Графикон». – М., 210. – 200с.
6. Miller A.J., Luheshi G.N., Rothwell N.J. et al. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272. – P. 857–861.
7. Trinchieri G. Immunobiology of interleukin-12 // *Immunol. Res.* – 1998. – Vol. 17. – P. 269–278.
8. Gattoni A., Parlato A., Vangieri B. et al. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts) // *Clin. Ter.* – 2006. – Vol. 157 – P. 377–386.
9. Brod S.A., Nelson L.D., Khan M. et al. Increased in vitro induced CD4+ and CD8+ T cell IFN-gamma and CD4+ T cell IL-10 production in stable relapsing multiple sclerosis // *Int. J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 90. – P. 187–202.
10. Lima M.C., Pereira G.M., Rumjanek F.D. et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy // *Scand. J. Immunol.* – 2000 – Vol. 51. – P. 419–428.
11. Sanceau J., Wijdenes J., Revel M., Wietzerbin J. IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human monocytic cell line (THP-1). Priming effect of IFN-gamma // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 147. P. 2630–2637.
12. Daly C., Rollins B.J. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies // *Microcirculation.* – 2003. – Vol. 10. – P. 247 – 257.

РЕЗЮМЕ

Исследовали влияние растительных препаратов метосепт, витанорм, максифам и бактрум на синтез про- и противовоспалительных цитокинов у мышей. Смесь препаратов вводили перорально в дозах 0,7 и 7,0 мг/мышь в течение 2-х недель. Уровень цитокинов: ИЛ-12, ИНФ γ , ИЛ-10, ФНО α , ИЛ-6 и МСР-1 оценивали при помощи проточной цитометрии в сыворотке крови неинфицированных мышей или через 1.5 и 3 часа после внутрибрюшинного введения бактериального эндотоксина ЛПС (45 μ г/кг). Анализ полученных данных показал, что комплексное применение препаратов оказывает дозо-зависимый модулирующий эффект на синтез и секрецию цитокинов. Под действием препаратов в дозе 0,7 мг/мышь уровень цитокинов не изменялся или незначительно снижался как у неинфицированных мышей, так и после введения ЛПС. После приема препаратов в дозе 7 мг/мышь уровень цитокинов в сыворотке крови достоверно увеличивался во всех исследованных группах мышей. Заключается, что фитопрепараты при их комплексном применении включаются в регуляцию синтеза про- и противовоспалительных цитокинов, обеспечивая устойчивость организма к бактериальной инфекции.

Ключевые слова: метосепт, витанорм, максифам, бактрум, регуляция, цитокины воспаления, мыши

ABSTRACT

The influence of plant preparations metosept, vitanorm, maxifam and baktrum on the pro- and antiinflammatory cytokine synthesis in mice has been investigated. Mice received a mix of preparations (0.7 and 7.0 mg/mouse) per os within two weeks. Cytokine levels: interleukin (IL) 12, interferon (INF) γ , IL-10, tumor necrosis factor (TNF) α , IL-6 and monocyte chemotactic protein (MCP-1) were measured by flow cytometry in blood serum of uninfected mice or at 1.5–3 hours after intraperitoneal injection with LPS (45 μ g/kg). According to received data, complex application of preparations modulates the cytokine synthesis and secretion in dose-dependent manner. A mix of preparations did not change or slightly suppressed the level of cytokines in a dose of 0.7 mg/mouse in uninfected mice and after injection with LPS. The level of cytokines was significant increased in a dose of 7.0 mg/mouse in blood. Thus, complex application of preparations regulates the synthesis of pro- and antiinflammatory cytokines, providing immunity to a bacterial infection.

Key words: metosept, vitanorm, maxifam, baktrum, regulation, inflammatory cytokines, mice.

Контакты:

Василенко Алексей Михайлович. E-mail:vasilenko-a-m@mail.ru