

Иммунокорригирующее действие микростима при экспериментальном иммунодефиците

Л. П. Чистохина, Г. М. Сафонова, В. А. Несчисляев

Филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», Пермь, Россия

Immunocorrective Action of Microstim Under Experimental Immunodeficiency

L.P. Chistokhina, G.M. Safonova, V.A. Neschislyayev

Perm branch «BIOMED» of MICROGEN State Company, Perm, Russia

Аннотация

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что новый пробиотик микростим, содержащий низкомолекулярные метаболиты *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, способен защитить иммунную систему от супрессивного действия циклофосамида. Эффект проявился в восстановлении количества лейкоцитов периферической крови, клеточности костного мозга и показателей гуморального иммунного ответа.

Ключевые слова

Низкомолекулярные метаболиты лактобактерий, иммунокорригирующее действие, иммунодефицит, циклофосфамид.

Многочисленные исследования функциональной активности микрофлоры человека и изучение механизма действия пробиотических препаратов подтверждают способность лактобактерий оказывать положительное влияние на различные звенья иммунной системы [1]. Установлено, что под влиянием лактобактерий повышается фагоцитарная активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда, активируется кислородозависимая микробицидность фагоцитов, стимулируются реакции Т-клеточного иммунитета, увеличивается продукция sIgA и γ -интерферона, нормализуется число В-лимфоцитов и стимулируется гуморальный ответ к антигенам различного происхождения [2, 3, 4].

Действие молочнокислых бактерий на иммунную систему в первую очередь связывают с влиянием пептидогликана клеточной стенки, являющегося известным поликлональным индуктором и иммуномодулятором. В процессе роста и развития бактериальной клетки пептидогликан не остается неизменным, а постоянно обновляется. Наряду с синтезом нового пептидогликана происходит деградация старых участков под действием автолизина с выделе-

Summary

The results of experiment indicate that new probiotic microstim, containing low-molecular metabolites of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, is capable to protect immune system from suppression action of cyclophosphamide. The effect was showed in restoration of quantity leukocytes of peripheral blood, number of nucleated cells in bone marrow and parameters of humoral immune response.

Keywords

Low-molecular metabolites of lactobacillus, immunocorrective action, immunodeficiency, cyclophosphamide.

нием в среду культивирования его низкомолекулярных фрагментов [5]. Влияние на иммунокомпетентные клетки оказывают также рибосомы, тейхоевые кислоты клеточной стенки, полисахаридные и пептидные компоненты микроорганизма. Таким образом, в культуральной жидкости бактерий содержится комплекс иммунологически активных веществ.

В Пермском НПО «Биомед» по оригинальной технологии получен препарат микростим, сырьем для производства которого является культуральная жидкость бактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, используемого в производстве препарата «Лактобактерин сухой». Действующим началом микростима являются низкомолекулярные (менее 15 кД) метаболиты лактобактерий, выделенные из культуральной жидкости с помощью ультрафильтрации.

Исследования общетоксического действия и аллергенных свойств препарата, проведенные в соответствии с требованиями Фармакологического комитета МЗ РФ, показали, что микростим не имеет аллергенных свойств и практически безвреден. Доклинические испытания биологической активности препарата свидетельствуют, что микростим обладает пробиотическим

действием (стимулирует рост и функциональную активность лакто- и бифидобактерий, угнетает рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов) [6]. В настоящее время разрабатывается программа клинических испытаний микростима в качестве препарата для профилактики и лечения дисбактериозов.

Выявление у нового пробиотического препарата иммуномодулирующей активности является актуальным, так как дисбактериозы и кишечные инфекции неизменно сопровождаются нарушением иммунного статуса [7, 8, 9].

Целью настоящей работы явилось исследование иммуностропной активности микростима при экспериментальном иммунодефиците, индуцированном введением циклофосамида.

Материал и методы

Экспериментальный иммунодефицит моделировали введением белым беспородным мышам-самцам массой 18–20 г. внутривентриально однократно циклофосамида (ЦФ) в дозе 100 мг/кг [10]. Микростим начинали давать через сутки после введения ЦФ в дозах 0,14 мл/кг (первая опытная группа) и 1,4 мл/кг (вторая опытная группа) один раз в день внутривентриально с помощью зонда в течение 3 дней. Через 1 ч после последнего введения препарата мышей иммунизировали внутривентриально эритроцитами барана (ЭБ) в оптимальной дозе (2×10^8 на мышь). Показатели опытных групп животных сравнивали с результатами в двух группах мышей, не получавших микростим: животных без иммунодефицита и мышей с иммунодефицитом, индуцированным той же дозой ЦФ. На 5-й день после иммунизации животных забивали и оценивали влияние микростима на количество лейкоцитов периферической крови, клеточность костного мозга, массу и клеточность тимуса и селезенки, а также на выраженность гуморального иммунного ответа к ЭБ.

Определение числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке проводили методом локального гемолиза в геле агарозы [11]. Результаты, учитывая \log -нормальное распределение данных [12], выражали в виде \log_{10} АОК на 10^6 ядросодержащих клеток (ЯСК) и на весь орган. Количество антител в сыворотке крови определяли в реакции активной гемагглютинации [13], результаты которой выражали величиной отрицательных \log_2 титра антител. Определение числа лейкоцитов, клеточности и массы органов лимфомиелоидного комплекса проводили общепринятыми методами.

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики и представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий между группами оценивали с помощью непарного t -критерия Стьюдента [14].

Результаты и обсуждение

Однократное введение ЦФ в дозе 100 мг/кг привело к достоверному снижению количества лейкоци-

тов периферической крови, клеток костного мозга, массы и клеточности тимуса и выраженной супрессии гуморального иммунного ответа (табл. 1, 2, 3). Такое влияние цитостатика связано с особенностями его действия — препарат одинаково угнетает все пролиферирующие клетки путем алкилирования ДНК и РНК ядра [15].

Пероральное введение микростима после инъекции ЦФ способствовало устранению негативного влияния цитостатика на клеточность костного мозга и количество лейкоцитов периферической крови (табл. 1). При этом четко прослеживается дозозависимое действие микростима. Более высокая доза (1,4 мл/кг) уже после трех дней введения препарата восстанавливает количество лейкоцитов и клеток костного мозга до уровня показателей в группе животных без иммунодефицита.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, установивших, что препараты из лактобактерий способны эффективно восстанавливать число лейкоцитов после проведения курса химио- или лучевой терапии у животных и онкологических больных [16, 17]. Известно, что продукты жизнедеятельности лактобактерий оказывают антимутагенное действие и являются мощными индукторами синтеза цитокинов макрофагами [18, 19]. Поэтому в основе предотвращения опустошения костного мозга может лежать как уменьшение повреждающего действия цитостатика на нуклеиновые кислоты делящихся клеток (антимутагенный эффект), так и активация цитокинами пролиферации и дифференцировки покоящихся клеток-предшественников.

Индуцированный ЦФ иммунодефицит проявился снижением количества клеток в тимусе, масса органа уменьшилась более чем в два раза (табл. 2). Клеточность и масса селезенки на фоне введения ЦФ достоверно не изменились, выявлено лишь снижение относительного показателя клеточности этого органа в расчете на 1 мг массы. Кратковременное действие микростима (введение препарата в течение 3 дней) оказалось недостаточным для восстановления массы и клеточности тимуса при столь значительном их снижении.

Наиболее выраженным оказался протективный эффект микростима на показатели гуморального иммунного ответа (табл. 3). Обе использованные дозы препарата способствовали достоверному восстановлению сниженного количества АОК в селезенке и титра гемагглютининов в сыворотке крови.

Заключение

Таким образом, в условиях экспериментального иммунодефицита, индуцированного введением ЦФ, микростим восстанавливает общее количество лейкоцитов крови, клеток костного мозга и показатели гуморального иммунного ответа.

Таблица 1

Влияние микростима на количество лейкоцитов в периферической крови и клеточность костного мозга мышей на фоне иммуносупрессии, индуцированной однократным введением ЦФ

№	Группы животных	Доза микро- стима, мл/кг	Количество животных	Количество крови, лейкоцитов $\times 10^9/\text{л}$	Количество клеток в костном мозге бедренной кости, $\times 10^6$
1	Контроль	–	10	$8,42 \pm 0,70$	$20,05 \pm 1,24$
2	ЦФ	–	9	$6,53 \pm 0,46^*$	$15,46 \pm 1,52^*$
3	ЦФ + микростим	0,14	9	$7,24 \pm 0,56$	$19,52 \pm 0,88\#$
		1,4	10	$8,65 \pm 0,79\#$	$20,19 \pm 1,19\#$

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой;
– $p < 0,05$ в сравнении с ЦФ

Таблица 2

Влияние микростима на массу и клеточность тимуса и селезенки на фоне экспериментального иммунодефицита

№	Группы животных	Доза микро- стима, мл/кг	Количество животных	Масса органа в мг	Количество клеток на орган, $\times 10^6$	Количество клеток на 1 мг массы органа, $\times 10^6$
Тимус						
1	Контроль ЦФ	–	10	$47,10 \pm 2,55$	$69,13 \pm 9,35$	$1,41 \pm 0,15$
		–	9	$21,11 \pm 3,24^{***}$	$22,84 \pm 5,28^{***}$	$0,98 \pm 0,12^*$
2	ЦФ + микростим	0,14	9	$22,61 \pm 2,49^{***}$	$22,23 \pm 4,30^{***}$	$0,97 \pm 0,16$
		1,4	10	$23,75 \pm 0,90^{***}$	$23,95 \pm 2,48^{***}$	$1,02 \pm 0,12$
Селезенка						
3	Контроль ЦФ	–	10	$177,80 \pm 21,77$	$299,32 \pm 39,04$	$1,73 \pm 0,17$
		–	9	$215,22 \pm 26,70$	$242,40 \pm 27,22$	$1,16 \pm 0,10^*$
4	ЦФ + микростим	0,14	9	$224,89 \pm 13,45$	$280,71 \pm 35,73$	$1,24 \pm 0,13^*$
		1,4	10	$203,80 \pm 28,43$	$268,40 \pm 27,06$	$1,21 \pm 0,10^*$

Примечание: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой

Таблица 3

Влияние микростима на показатели гуморального иммунного ответа на фоне иммуносупрессии, вызванной однократным введением ЦФ

№	Группа животных	Доза микро- стима, мл/кг	Количество животных	Log_{10} числа АОК на 10^6 ЯСК селезенки	Log_{10} числа АОК на селезенку	Титр гемагглютини- нов, ($-\text{log}_2$ титра)
1	Контроль	–	10	$2,1598 \pm 0,0267$ (144,49)	$4,6042 \pm 0,0538$ (40199,98)	$9,40 \pm 0,34$
2	ЦФ	–	9	$1,9440 \pm 0,0587^{**}$ (87,90)	$4,3020 \pm 0,0890^*$ (20045,72)	$7,22 \pm 0,40^{***}$
3	ЦФ + микростим	0,14	9	$2,1333 \pm 0,0612\#$ (135,92)	$4,5667 \pm 0,0703\#$ (35957,53)	$8,67 \pm 0,47\#$
		1,4	10	$2,1807 \pm 0,0837\#$ (151,60)	$4,6247 \pm 0,0888\#$ (38353,66)	$9,30 \pm 0,45\#\#$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ в сравнении с ЦФ. В скобках указана средняя геометрическая числа АОК (антилогарифм из средней арифметической log_{10} числа АОК)

Литература

1. Бондаренко В.М., Рубакова Э.И., Лаврова В.А. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве основы препаратов пробиотиков. Журн. микробиол. 1998; 5: 107–112.
2. Воробьев А.А., Лыкова Е.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции. Журн. микробиол. 1999; 6: 102–105.
3. Горская Е.М. Повышение неспецифической резистентности макроорганизма при пероральном применении зубиотиков из лактобацилл. Иммунобиологические препараты. Сб. трудов. М., 1989: 181–185.
4. Мальцева Н.Н., Шкарупета М.М., Пинегин Б.В., Коршунов В.М. Иммуномодулирующие свойства некоторых микробов — представителей нормальной микрофлоры кишечника. Антибиотики и химиотерапия. 1992; 37 (12): 41–43.
5. Горин С.Е., Есипова В.В., Навашин С.М. Получение иммунологически активных фрагментов пептидогликана бактериальной клеточной стенки. Иммуномодуляторы. Сб. трудов. М., 1987: 77–88.
6. Несчисляев В.А., Сафонова Г.М., Чистохина Л.П. Новый пробиотический препарат «Микростим». Пробиотические микроорганизмы — современное состояние вопроса и перспективы использования. Матер. Междунар. научно-практич. конф. М., 2002: 49–50.
7. Бурмистрова А.Л. Иммунный гомеостаз и микросимбиоз. Метаморфозы и пути развития воспалительных заболеваний кишечника. Челябинск; 1997.
8. Куваева И.Б., Ладодо К.С. Микроэкологические и иммунологические нарушения у детей. М.: Медицина; 1991.
9. Мотавкина Н.С., Чубенко Г.И., Сильчук Н.В. Иммунный статус у детей с кишечными инфекциями различной этиологии. Иммунопатология, аллергол., инфектол. 2001; 2: 91–97.
10. Bin Hafeez B, Haque R, Parvez S, Pandey S, Sayeed I, Raisuddin S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. International Immunopharmacology 2003; 3 (2): 257–265.
11. Jerne NK, Nordin AA. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 1963; 140 (3365): 405–405.
12. Лозовой В.П., Губарев В.В., Наумова Е.Н., Елисеева Т.В. О зонах распределения иммунологических показателей. Иммунология. 1989; 2: 50–53.
13. Зигль Э. Реакция гемагглютинации. Иммунологические методы. Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем. М.: Мир; 1979: 108–112.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
15. Полянцева Л.Р., Гордовская Н.Б., Краснова Т.Н. Осложнения цитостатической терапии. Тер. архив. 1989; 12: 63–66.
16. Воспьяков В.Г., Петров Л.Н., Калинина И.М. и соавт. Гликопептиды лактобацилл — регуляторы гемопоэза и иммунитета. Рус. журн. «ВИЧ/СПИД и родств. пробл.». 2000; 1: 31–32.
17. Mosienko MD, Lyniv LS, Kireeva SS, Ryabukha VM, Mosienko VS. The protective action of immunomodulator of bacterial origin and melatonin in mice with cyclophosphamide-induced myelosuppression. Experimental Oncology 2002; 24: 145–149.
18. Воробьева Л.И., Абишев С.К. Антимутагенные свойства бактерий (обзор). Прикл. биохимия и микробиол. 2002; 38 (2): 115–127.
19. Gibson GR, Fuller R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr 2000; 130 (2): 391–395.