

УДК 615.322

DOI: 10.14427/jirai.2017.1.16

## Изучение спектра иммуотропного действия капель Плетнева №60 (фосфолитена)

В.В. Плетнев, Б.В. Пинегин

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24.

### Studying the spectrum of immunotropic action of Pletnev drops No 60 (Phospholiten)

V.V. Pletnev, B.V. Pinegin

National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia

#### Аннотация

Целью настоящей работы было изучение иммуномодулирующего действия капель Плетнева №60. На основании полученных результатов установлено, что капли Плетнева №60 обладают иммуномодулирующими свойствами, в диапазоне испытанных доз стимулируют гуморальный и клеточный иммунитет, бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышей, бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека, повышают продукцию фактора некроза опухоли- $\alpha$  мононуклеарными клетками человека, количество лейкоцитов периферической крови мышей. Капли Плетнева №60 повышают выживаемость животных. Капли Плетнева №60 обладают антиоксидантными свойствами и под его влиянием наблюдается подавление спонтанной и зимозаниндуцированной хемилюминесценции лейкоцитов периферической крови мышей, подавление люминол-зависимых и люцигенинзависимых спонтанных и зимозаниндуцированных хемилюминесценций лейкоцитов человека.

#### Ключевые слова

Гуморальный иммунитет, капли Плетнева №60, клеточный иммунитет, мононуклеарные клетки.

Характерной чертой начала 21-го века является существенный рост острых и хронических инфекционных заболеваний бактериальной, грибковой, протозойной и вирусной природы. Возвращаются заболевания, которые были частыми в 19-ом веке и почти исчезли в 20-ом веке, например, туберкулез, малярия, дифтерия и др.

#### Summary

The purpose of the present work was studying of immunomodulating activity of Pletnev drops No 60. On the basis of the received results it is established that Pletnev drops No 60 possess immunomodulatory properties, stimulates humoral and cellular immunity, the bactericidal activity of peritoneal exudate cells of mice, bactericidal activity of phagocytes of peripheral blood, promote production of TNF- $\alpha$  by mononuclear cells, the number of peripheral blood leukocytes of mice. Pletnev drops No 60 increase the survival of animals. Pletnev drops No 60 possess antioxidant properties and, under his influence, the observed suppression of spontaneous and simhasan-induced of chemiluminescence of peripheral blood leukocytes of mice and suppression of luminol-dependent and lucigenin-dependent spontaneous and simhasan-induced of chemiluminescence of leukocytes of man.

#### Keywords

Humoral immunity, Pletnev drops No 60, cellular immunity, mononuclear cells.

и появляются новые инфекционные процессы, например, ВИЧ-инфекция. Наблюдается рост инфекционно-воспалительных заболеваний различной этиологии и локализации. Этиологическим фактором часто являются условно-патогенные или оппортунистические микробы, обладающие множественной устойчивостью к

антибиотикам, с атипичными биологическими свойствами. Это является следствием снижения иммунологической реактивности всего населения планеты. На фоне снижения функций иммунной системы применение даже высокоэффективных антибиотиков последнего поколения не всегда дает хороший клинический эффект.

В этой связи одной из важнейших проблем современной медицины становится коррекция ослабленных функций иммунной системы с помощью высокоэффективных иммуномодулирующих лекарственных средств, поиск и создание которых, являются актуальными.

В настоящее время пристальное внимание исследователей привлекает изучение роли микроэлементов и витаминов в нормальном функционировании иммунной системы. Установлено, что такие вещества как витамины А, С, В12,  $\beta$ -каротин, фолиевая кислота, рибофлавин, железо, цинк и селен обладают иммуномодулирующими свойствами и их недостаточность ведет к ослаблению иммунитета и повышению инфекционной заболеваемости [2, 3].

Большинство из этих перечисленных веществ обладают антиоксидантными свойствами, что очень важно при лечении ряда таких тяжелых заболеваний человека, как атеросклероз, преждевременное старение, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания и др. К веществам с выраженными иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами относится микроэлемент селен и его производные. Селеносодержащие вещества повышают иммунологическую реактивность, следствием чего является снижение инфекционной заболеваемости [5, 6].

В настоящее время активно разрабатываются лекарственные средства и биологически активные добавки, содержащие селен – незаменимый микроэлемент, обладающий широким спектром биологической активности и целым рядом фармакологических свойств, в том числе высокой антиоксидантной активностью [4].

В этой связи является актуальным изучение иммуотропных свойств комплексного растительного препарата, содержащего селен, – «Капли Плетнева №60».

#### Условия эксперимента

Для проведения исследований использовали капли Плетнева №60.

КП №60 являются комплексным растительным препаратом внутриаптечного изготовления, запатентованным в России [1].

Для получения КП №60 используется тмин обыкновенный – *Fructus carvi L.*, семейство зонтичные – *Ariaceae*; кукуруза обыкновенная – *Zea mays L.*, семейство злаки – *Gramineae*; лопух большой – *Arctium lappa L.*, семейство сложноцветковые – *Compositae*.

Препарат имеет в своем составе селен, кварцевитин, фосфолипиды, яблочную и лимонную кислоты.

Изучение иммуотропного действия КП №60 проведено с использованием ряда методов, позволяющих оценить влияние препарата на различные звенья системы иммунитета.

Исследование влияния КП №60 на гуморальный и клеточный иммунитет проведено на мышцах-гибридах F1(CBAxС57Bl6). Влияние КП №60 на гуморальный иммунный ответ оценивали по накоплению АОК в селезенках мышей на 4-е сутки после иммунизации по методу Каннингема.

Показателем клеточного иммунного ответа служила реакция ГЗТ, величину которой определяли индексу ГЗТ – (отношение толщины опытной лапки к контрольной).

Изучение влияния КП №60 на устойчивость мышей к стафилококковой инфекции проведено на мышцах-гибридах F1(CBAxС57Bl6), которых заражали летальной дозой (1010 клеток/мышь) *Staphylococcus pyogenes* (штамм Wood-46). Эффект оценивали по количеству выживших мышей.

Исследование влияния КП №60 на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата проведено на мышцах-гибридах F1(CBAxС57Bl6). Для постановки реакции внутриклеточного киллинга использован *Staphylococcus aureus* меченный флюоресцеина изотиоцианатом.

Клетки перитонеального экссудата получали путем промывания брюшной полости животных физиологическим раствором и довели концентрацию клеток до 2 млн/мл.

Исследование влияния КП №60 на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата проведено с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur (США).

При изучении влияния КП №60 на внутриклеточную бактерицидность фагоцитов периферической крови человека использовали *Staphylococcus aureus* меченный флюоресцеина изотиоцианатом. Исследование влияния КП №60 на внутриклеточную бактерицидность проведено с помощью проточного цитофлуориметра FACSCalibur (США). При этом выделяли облако стафилококка и анализировали флюоресценцию

на каналах FL1(535 нм) и FL3(585 нм), учет проводили по проценту клеток с двойной меткой (погибший стафилококк) по отношению к общему числу клеток.

Исследование влияния КП №60 на количество и хемилюминесценцию лейкоцитов периферической крови выполняли на мышах-гибридах F1(СВАхС57В16). Селезенки извлекали и подсчитывали количество ядродержащих клеток. Реакцию хемилюминесценции проводили в триплетах. Оценивали уровень спонтанной и индуцированной зимозаном (Sigma, 10 мкл 1 % суспензии на пробу) хемилюминесценции по максимальным значениям кинетической кривой на хемилуцинометре «Lum-5773» (Россия). Результаты по сумме 3-х измерений на каждую пробу выражали в виде среднего числа импульсов в мин на 100 мкл суспензии клеток и в пересчете на концентрацию клеток в соответствующей суспензии ( $\times 10^{-6}$  для периферической крови).

Изучение влияния КП №60 на люминолзависимую и люцигенинзависимую хемилюминесценцию нейтрофилов проведены на образцах венозной крови здоровых добровольцев. Забор крови производили утром натощак из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом, в качестве которого применяли гепарин в концентрации 10 Ед/мл. Было обследовано 6 здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 35 лет. Оценку хемилюминесценции проводили при помощи хемилуцинометра LUCY 1 (Австрия).

Анализ хемилюминесценции нейтрофилов выявляет образование клетками активных кислородных радикалов, включая супероксидный анион, синглетный кислород, гидроксильный радикал, перекись водорода. Образующиеся кислородные метаболиты обладают выраженными бактерицидными свойствами.

Для усиления ХЛ применяется люминол (Sigma) и люцигенин (Sigma), обладающие свойством окисляться под влиянием кислородных метаболитов и генерировать квант света (440 nm), что существенно повышает чувствительность реакции. Люминолзависимая ХЛ в большей степени отражает продукцию  $H_2O_2$ , люцигенинзависимая –  $O_2$ .

При исследовании влияния КП №60 на апоптоз мононуклеарные клетки выделяли из крови доноров с помощью одноступенчатого градиента плотности фиколл-верографии  $d = 1,077$  (ПанЭко). Для этого гепаринизированную кровь (20 Ед/мл) разводили в 2 раза средой 199 (ПанЭко) и наслаивали на фиколл. Пробирки центрифугировали в течение 40 мин с 400g при  $t = 20-25^\circ C$ .

Клетки в интерфазе стерильно собирали и дважды отмывали в среде 199. Жизнеспособность клеток после выделения составляла 98-99 % (по методу окраски 0,1 % раствором трипанового синего(Serva)).

Для активации лимфоцитов использовали ФГА (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл. МНК культивировали в присутствии ФГА при  $t = 37^\circ C$  и 5 %  $CO_2$  в концентрации  $5 \times 10^5$  кл/мл в плоскодонных 96-луночных культуральных планшетах (Nunc) в среде RPMI 1640, содержащей 10 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma) и 2 mM L-глутамин (Sigma).

Исследование добавляли в культуру МНК на все время культивирования в концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл ставили триплеты для каждой концентрации. Через 72 ч клетки отмывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР) и для пермеабиллизации фиксировали охлажденным 70 % этиловым спиртом при  $t = 4^\circ C$  в течение 1 часа. От спирта освобождались последующим центрифугированием. К полученному осадку клеток добавляли иодид пропидиума (Sigma, 5 мкг/мл), приготовленный на ЗФР с добавлением 0,1 % тритона X-100 и 0,1 % цитрата натрия.

Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson) с аргоновым лазером с длиной волны 488 нм в программе CellQuest. С помощью прямого и бокового светорассеяния (FSC и SSC) определяли локализацию лимфоцитов и оценивали флуоресценцию клеток содержащих иодид пропидиума по FL-2. Для оценки доли клеток в апоптозе определяли гиподиплоидную фракцию, т.е. количество клеток с частичной потерей ДНК. Помимо этого данный метод позволяет определить и процент гипердиплоидных клеток, т.е. клеток имеющих повышенное содержание ДНК в результате образования бластных форм лимфоцитов, образующихся под влиянием митогенного действия ФГА.

При исследовании влияния КП №60 на продукцию ФНО- $\alpha$  мононуклеарные клетки выделяли по ранее используемой методике.

Индукция выработки цитокинов. Мононуклеары в количестве 200000 клеток/лунку инкубировали в плоскодонном 96-луночном планшете в среде RPMI 1640 (Sigma), содержащей 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко) и 2 mM L-глутамин (Sigma) при  $37^\circ C$  в атмосфере 5 %  $CO_2$  в дублях в присутствии или без стимулятора: КП №60 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл при  $37^\circ C$  в атмосфере 5 %  $CO_2$  в течение 48 ч. Супернатанты собирали и хранили при  $-20^\circ C$ .

Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов ФНО- $\alpha$ -ИФА «Прокоп» (Санкт-Петербург) в соответствии с прилагающимися к ним протоколами.

## Результаты и обсуждение

### Влияние капель Плетнева №60 на гуморальный и клеточный иммунитет

Исследование проведено на мышах-гибридах F1(СВАхС57В16) в двух сериях экспериментов. В I серии оценивали влияние препарата на гуморальный иммунный ответ по накоплению антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей, во II серии – влияние препарата на клеточный иммунный ответ в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

I серия. Исследования проведены на 5 группах мышей F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г) по 10 животных в каждой: 1 группа – контроль; 2 группа – КП №60 0,1 мкг/кг; 3 группа – КП №60 1 мкг/кг; 4 группа – КП №60 10 мкг/кг; 5 группа – КП №60 100 мкг/кг. КП №60 вводили подкожно в указанных дозах за 3 часа до внутрибрюшинной иммунизации эритроцитами барана в субтотальной дозе  $3 \times 10^8$  клеток/мышь. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили только эритроциты барана в указанной иммуногенной дозе.

Влияние КП №60 на гуморальный иммунитет оценивали по методу Каннинггема по накоплению АОК в селезенке мышей на 4-е сутки после иммунизации.

Проведенные исследования показали, что КП №60 в испытанных дозах 0,1, 1 и 100 мкг/кг оказывают стимулирующее действие на гуморальный иммунитет у мышей, статистически достоверно ( $P < 0,05$ ) повышая накопление АОК в селезенках (таблица 1).

Стимулирующее действие КП №60 проявлялось при пересчете числа АОК как на селезенку, так и на 1 млн кариоцитов селезенки. КП №60 в дозе 10 мкг/кг не обладали стимулирующим действием на гуморальный иммунитет.

II серия. Исследования проведены на 40 мышах F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г), которые были разделены на 5 групп, по 10 животных в каждой. Мышей иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе  $2 \times 10^8$  клеток/мышь. Мышам 2, 3, 4 и 5 групп за 3 часа до иммунизации подкожно вводили КП №60 в дозах 0,1, 1, 10 и 100 мкг/кг. На 5 сутки после иммунизации все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию эритроцитов барана в дозе  $1 \times 10^8$  клеток/мышь. В подушечку контрлатеральной лапы («контрольная лапа») инъецировали 50 мкл стерильного физиологического раствора. Результаты реакции регистрировали через 24 часа по величине отека (толщина лапы) опытной и контрольной лап, и их соотношению – индексу ГЗТ.

В таблице 2 отражены результаты оценки влияния КП №60 на клеточный иммунный ответ. Из данных, представленных в таблице 2 следует, что препарат в дозе 10 мкг/кг усиливал выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Таким образом, капли Плетнева №60, вводимые подкожно в дозах 0,1, 1 и 100 мкг/кг за 3 часа до иммунизации эритроцитами барана, стимулируют гуморальный тимусзависимый иммунный ответ, а в дозе 10 мкг/кг – клеточный иммунный ответ.

### Влияние КП №60 на устойчивость мышей к стафилококковой инфекции

Исследование проведено на мышах-гибридах F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г), которые были распределены на 5 групп по 12

Таблица 1. Влияние КП №60 на показатели гуморального иммунного ответа у мышей.

Группы животных	Доза препарата, мкг/кг	Количество АОК на селезенку	Количество кариоцитов в селезенке, $\times 10^8$	Количество АОК на $10^6$ спленоцитов
1 – контроль	$3 \times 10^8$ кл/мышь	$6000 \pm 1672$	$1,2 \pm 0,26$	$50 \pm 13,5$
2 – КП №60	0,1	$20750 \pm 1124^*$	$1,48 \pm 0,21$	$140,2 \pm 7,0^*$
3 – КП №60	1	$17000 \pm 1000^*$	$1,8 \pm 0,33$	$94,4 \pm 4,72^*$
4 – КП №60	10	$10500 \pm 750$	$1,5 \pm 0,24$	$70,0 \pm 4,9$
5 – КП №60	100	$23000 \pm 240^*$	$1,51 \pm 0,05$	$152,3 \pm 1,52^*$

\* – здесь и во всех последующих таблицах обозначает статистически достоверные различия с контролем при  $P < 0,05$ .

животных в группе: 1 – контроль; животные 2, 3, 4 и 5 групп, получали п/к инъекции КП №60 соответственно в дозах 0,1, 1, 10 и 100 мкг/кг. Животным контрольной группы подкожно вводили физиологический раствор. На следующие сутки после введения препарата мышам заражали летальной дозой ( $10^{10}$  клеток/мышь) *Staphylococcus pyogenes* (штамм Wood-46). Эффект оценивали по количеству выживших мышам на 10 сутки и по продолжительности жизни погибших животных.

Результаты эксперимента представлены в таблице 3. Все исследованные дозы КП №60 повышали устойчивость мышам к стафилококковой инфекции. При этом максимальный эффект наблюдался при назначении КП №60 в дозе 10 мкг/кг.

Таким образом, КП №60 в дозах 0,1, 1, 10 и 100 мкг/кг повышают устойчивость мышам к смертельной стафилококковой инфекции. Оптимальной защищающей дозой КП №60 является 10 мкг/кг.

#### Влияние КП №60 на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата

Исследование проведено на мышах-гибридах F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г), которые были распределены на 4 группы по 12 животных в группе: 1 – контроль; животные 2, 3, и 4 групп, получали п/к инъекции КП №60 соответственно в дозах 1, 10 и 100 мкг/кг. Для постановки реакции внутриклеточного киллинга

был использован *Staphylococcus aureus* меченный флюоресцеина изотиоцианатом.

Результаты исследования влияния КП №60 в испытанных дозах на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышам представлены в таблице 4. КП №60 в дозах 1 и 10 мкг/кг достоверно повышали способность клеток убивать *Staphylococcus Aureus* на 60% и 48% соответственно. КП №60 в дозе 100 мкг/кг подавляли бактерицидность клеток перитонеального экссудата животных на 25% по сравнению с контролем.

Таким образом, капли Плетнева №60 в дозах 1 и 10 мкг/кг стимулируют бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышам на 60% и 48% соответственно, а в дозе 100 мкг/кг снижают этот показатель на 25% по сравнению с контролем.

#### Влияние КП №60 на внутриклеточную бактерицидность фагоцитов периферической крови

Исследования выполнены на образцах венозной крови 6 здоровых доноров-мужчин в возрасте 25-35 лет. Забор крови производили утром натощак из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом, в качестве которого применяли гепарин в концентрации 10 Ед/мл.

Исследование бактерицидной активности лейкоцитов под влиянием КП №60 показало, что препарат в концентрации 10 мкг/мл достоверно

повышает способность лейкоцитов убивать поглащенный стафилококк. После предварительной трехчасовой инкубации с КП №60 в концентрации 100 мкг/мл наблюдалось подавление бактерицидной активности лейкоцитов (таблица 5).

Таким образом, капли Плетнева №60 в концентрации 10 мкг/мл стимулируют бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека после предварительной инкубации с препаратом в течение 1-го и 3-х часов. КП №60 в концентрации 100 мкг/мл достоверно подавляют бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека после предварительной инкубации с препаратом в течение 3-х часов.

#### Влияние КП №60 на хемилюминесценцию и количество лейкоцитов периферической крови

Исследование проведено на мышах-гибридах F1(СВАхС57В16). Для разведения препарата был использован 4%-ный раствор этанола на физиологическом растворе, нагретый до 37°C. Для

проведения опыта были сформированы следующие группы мышам по 6 животных в каждой: 1 группа – контроль, 4%-ный раствор этанола; 2, 3 и 4 группы – получали п/к инъекции КП №60 в дозах 1, 10 и 100 мкг/кг. Забор материала осуществляли через 24 часа после введения препарата.

Результаты исследования изменений ХЛ под действием КП №60 представлены в таблице 6. КП №60 в дозах 10 и 100 мкг/кг достоверно снижали показатели спонтанной хемилюминесценции лейкоцитов периферической крови мышам на 34% и 50% соответственно. КП №60 в дозах 10 и 100 мкг/кг достоверно снижали показатели зимозаниндуцированной хемилюминесценции лейкоцитов периферической крови мышам на 38% и 47% соответственно.

Вместе с тем, КП №60 в дозах 1 и 10 мкг/кг не оказывали существенного влияния на количество лейкоцитов периферической крови. КП №60 в дозе 100 мкг/кг вызывали повышение количества лейкоцитов периферической крови на 49 % (таблица 7).

Таблица 2. Влияние КП №60 на показатели клеточного иммунного ответа у мышам

Группы животных	Доза препарата, мкг/кг	Толщина опытной лапки (мм)	Толщина контрольной лапки (мм)	Индекс ГЗТ
1 – контроль	2x10 <sup>8</sup> кл/мышь	3,3±0,3	2,2±0,23	1,5
2 – КП №60	0,1	3,2±0,3	2,2±0,3	1,45
3 – КП №60	1	3,0±0,3	2,0±0,2	1,5
4 – КП №60	10	4,0±0,37	2,0±0,2	2,0*
5 – КП №60	100	2,5±0,2	2,0±0,2	1,25

Таблица 3. Показатели устойчивости мышам линии F1(СВАхС57В16) к стафилококковой инфекции

Группы животных	Доза препарата, мкг/кг	Количество погибших мышам	% выживших мышам	Продолжительность жизни, сутки	Кратность увеличения продолжительности жизни
1 – контроль	-	10	16,0	1,4	-
2 – КП №60	0,1	6	50	4,4	3,1
3 – КП №60	1	5	58,3	3,6	2,6
4 – КП №60	10	4	66,6	4,4	3,1
5 – КП №60	100	7	33,3	2,6	1,8

Таблица 4. Влияние КП №60 на бактерицидную активность клеток перитонеального экссудата мышам

Группы животных	Бактерицидная активность, % к контролю
1 – контроль	21,2±2,3
2 – КП №60, 1 мкг/кг	34,0±4,9*
3 – КП №60, 10 мкг/кг	31,5±5,5*
4 – КП №60, 100 мкг/кг	15,8±1,2*

Таблица 5. Влияние КП №60 на бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека после предварительной инкубации с препаратом в течение 1-го и 3-х часов. Указан процент погибшего *Staphylococcus Aureus*

Концентрации препарата	Бактерицидная активность, % к контролю	
	1 час	3 часа
Контроль	26,5±4,3	30,7±3,1
КП №60, 1 мкг/мл	24,8±2,7	36,2±3,0
КП №60, 10 мкг/мл	36,2±2,4*	41,0±5,1*
КП №60, 100 мкг/мл	27,0±4,3	22,7±3,6*

Таблица 6. Влияние КП №60 на хемилюминесценцию лейкоцитов периферической крови мышам через 24 ч после введения препарата

Группы животных	Лейкоциты периферической крови	
	Спонтанная ХЛ, имп/мин	Зимозаниндуцированная ХЛ, имп/мин
1 – контроль	1239±306	5055±931
2 – КП №60, 1 мкг/кг	844±175	3686±1011
3 – КП №60, 10 мкг/кг	823±81*	3129±493*
4 – КП №60, 100 мкг/кг	627±91*	2671±675*

Таким образом, капли Плетнева №60 в дозах 10 и 100 мкг/кг достоверно подавляют спонтанную и зимозаниндуцированную хемиллюминесценцию лейкоцитов периферической крови мышей. КП №60 в дозе 100 мкг/кг увеличивают количество лейкоцитов периферической крови мышей на 49%.

#### Влияние КП №60 на люминолзависимую и люцигенинзависимую хемиллюминесценцию лейкоцитов

Исследования выполнены на образцах венозной крови 6 здоровых доноров-мужчин в возрасте 25-35 лет. Забор крови производили утром натошак из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом, в качестве которого применяли гепарин в концентрации 10 Ед/мл.

Результаты исследования влияния КП №60 на ХЛ лейкоцитов человека представлены в табли-

цах 8, 9, 10, 11. КП №60 в концентрации 100 мкг/мл достоверно подавляли все виды спонтанной и зимозаниндуцированной ХЛ в течение всего периода регистрации.

Таким образом, капли Плетнева №60 в концентрациях 1 и 10 мкг/мл при совместной инкубации с лейкоцитами периферической крови человека не оказывают значимого влияния на показатели хемиллюминесценции, а в концентрации 100 мкг/мл препарат достоверно подавляют люминолзависимую и люцигенинзависимую спонтанную и зимозаниндуцированную хемиллюминесценцию лейкоцитов человека.

#### Влияние КП №60 на апоптоз мононуклеарных клеток периферической крови

Исследования проведены на образцах крови 7 доноров-мужчин в возрасте от 25 до 35 лет. КП №60 в испытанных концентрациях не оказывали

достоверного влияния на процент гиподиплоидных клеток.

КП №60 в концентрации 100 мкг/мл достоверно влияли на снижение процента гипердиплоидных клеток. В присутствии препарата процент гипердиплоидных клеток достоверно ( $p < 0,05$ ) снижался с уровня  $11,70 \pm 2,14\%$  в контроле до  $4,92 \pm 0,74\%$ . Полученные результаты представлены в таблице 12.

Таким образом, капли Плетнева №60 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл не оказывают достоверного влияния на активированный апоптоз лимфоцитов. КП №60 в концентрации 100 мкг/мл достоверно подавляют деление лимфоцитов.

#### Влияние КП №60 на продукцию ФНО- $\alpha$ мононуклеарами периферической крови

Исследования проведены на образцах крови 5 доноров-мужчин в возрасте от 25 до 35

лет. У всех обследованных доноров наблюдалось повышение продукции ФНО- $\alpha$  при использовании КП №60 в концентрациях 1 и 10 мкг/мл. КП №60 в концентрации 100 мкг/мл не влияли на продукцию цитокина и показатели ФНО- $\alpha$  были на уровне спонтанной продукции. Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таким образом, капли Плетнева №60 в концентрациях 1 и 10 мкг/мл достоверно повышают продукцию ФНО- $\alpha$  мононуклеарными клетками человека, а в концентрации 100 мкг/мл не влияют на продукцию этого цитокина.

#### Выводы

Капли Плетнева №60 обладают иммуномодулирующими свойствами, в диапазоне испытанных доз 10-100 мкг/кг стимулируют гуморальный и клеточный иммунитет, бактерицидную актив-

**Таблица 7. Влияние КП №60 на количество лейкоцитов периферической крови мышей через 24 ч после введения**

Группы животных	Лейкоциты периферической крови, $\times 10^6$ клеток/мл
1 – контроль	0,89 $\pm$ 0,1
2 – КП №60, 1 мкг/кг	0,91 $\pm$ 0,06
3 – КП №60, 10 мкг/кг	0,90 $\pm$ 0,05
4 – КП №60, 100 мкг/кг	1,33 $\pm$ 0,16*

**Таблица 8. Влияние КП №60 на люминолзависимую хемиллюминесценцию лейкоцитов человека без стимуляции зимозаном**

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	КП №60, мкг/ПВИмл		
		1	10	100
1	6,98 $\pm$ 3,09	8,7 $\pm$ 3,39	8,28 $\pm$ 2,58	4,63 $\pm$ 3,1*
7	9,42 $\pm$ 4,44	9,97 $\pm$ 3,6	9,22 $\pm$ 2,89	5,6 $\pm$ 2,05*
11	11,35 $\pm$ 5,88	11,32 $\pm$ 3,9	10,78 $\pm$ 2,9	6,32 $\pm$ 1,9*
15	14,32 $\pm$ 5,63	14,3 $\pm$ 4,58	12,23 $\pm$ 3,1	6,65 $\pm$ 1,7*
19	12,83 $\pm$ 5,11	12,9 $\pm$ 3,95	11,3 $\pm$ 2,97	5,9 $\pm$ 1,72*

**Таблица 9. Влияние КП №60 на люцигенинзависимую хемиллюминесценцию лейкоцитов человека без стимуляции зимозаном**

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	КП №60, мкг/мл		
		1	10	100
1	1,02 $\pm$ 0,66	1,37 $\pm$ 0,69	1,33 $\pm$ 0,65	0,62 $\pm$ 0,12*
7	1,13 $\pm$ 0,76	1,77 $\pm$ 1,18	1,47 $\pm$ 0,69	0,70 $\pm$ 0,13*
11	1,25 $\pm$ 0,82	1,97 $\pm$ 1,32	1,68 $\pm$ 0,77	0,75 $\pm$ 0,18*
15	1,47 $\pm$ 0,92	2,13 $\pm$ 1,42	1,77 $\pm$ 0,94	0,83 $\pm$ 0,24*
19	1,28 $\pm$ 0,91	1,93 $\pm$ 1,27	1,48 $\pm$ 0,77	0,75 $\pm$ 0,19*

**Таблица 10. Влияние КП №60 на люминолзависимую хемиллюминесценцию лейкоцитов человека после стимуляции зимозаном**

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	КП №60, мкг/мл		
		1	10	100
1	106,2 $\pm$ 33,3	127,0 $\pm$ 39,7	111,3 $\pm$ 27,8	36,8 $\pm$ 12,2*
7	131,3 $\pm$ 41,6	147,5 $\pm$ 41,0	125,3 $\pm$ 27,6	39,8 $\pm$ 12,8*
11	179,5 $\pm$ 50,2	180,8 $\pm$ 52,0	165,2 $\pm$ 28,1	46,0 $\pm$ 14,8*
15	229,3 $\pm$ 53,0	247,8 $\pm$ 83,4	214,0 $\pm$ 35,3	56,7 $\pm$ 22,8*
19	203,3 $\pm$ 43,6	230,5 $\pm$ 70,4	188,2 $\pm$ 33,2	55,2 $\pm$ 21,3*

**Таблица 11. Влияние КП №60 на люцигенинзависимую хемиллюминесценцию лейкоцитов человека после стимуляции зимозаном**

Время регистрации ХЛ, мин	Контроль	КП №60, мкг/мл		
		1	10	100
1	21,67 $\pm$ 5,82	29,0 $\pm$ 14,6	22,2 $\pm$ 7,6	8,2 $\pm$ 4,5*
7	27,33 $\pm$ 6,8	33,33 $\pm$ 15,2	25,0 $\pm$ 6,0	9,8 $\pm$ 4,4*
11	32,67 $\pm$ 9,5	40,0 $\pm$ 16,8	30,7 $\pm$ 9,0	11,7 $\pm$ 4,1*
15	38,83 $\pm$ 6,88	48,50 $\pm$ 16,3	36,83 $\pm$ 7,8	13,33 $\pm$ 4,0*
19	33,67 $\pm$ 6,0	45,0 $\pm$ 16,3	33,17 $\pm$ 6,6	12,17 $\pm$ 4,1*

**Таблица 12. Влияние КП №60 на апоптоз (гиподиплоидную фракцию) и деление (гипердиплоидную фракцию) лимфоцитов периферической крови человека, активированных ФГА (% клеток)**

Дозы препарата	Апоптоз (гиподиплоидные клетки), %	Бласты (гипердиплоидные клетки), %
КП №60, 1 мкг/мл	15,2 $\pm$ 1,9	14,6 $\pm$ 2,7
КП №60, 10 мкг/мл	16,9 $\pm$ 2,2	12,8 $\pm$ 2,4
КП №60, 100 мкг/мл	25,1 $\pm$ 8,7	4,9 $\pm$ 0,7*

**Таблица 13. Влияние КП №60 на продукцию ФНО-α мононуклеарными клетками периферической крови человека**

№ донора	Концентрация ФНО-α, пг/мл			
	Спонтанная продукция	КП №60, мкг/мл		
		1	10	100
1	25,53	46,57	36,67	30,38
2	25,08	69,95	56,46	35,77
3	21,93	33,08	46,57	0
4	10,24	29,4	23,18	9,69
5	24,18	69,05	68,15	53,76
M±m	23,8±8,5	39,1±28,3*	41,2±19,8*	25,3±19,2

ность клеток перитонеального экссудата мышей, бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека, повышают продукцию ФНО-α мононуклеарными клетками человека, количество лейкоцитов периферической крови мышей.

При профилактическом введении в дозе 10 мкг/кг за 24 часа до заражения мышей летальной дозой *Staphylococcus pyogenes* капли Плетнева №60 повышают выживаемость животных до 66,6 % при 84 % гибели в контроле.

Капли Плетнева №60 обладают антиоксидантными свойствами и под его влиянием наблюдается подавление спонтанной и зимозаниндуцированной хемилюминесценции лейкоцитов периферической крови мышей, подавление люминол- и люцигенинзависимых спонтанных и зимозаниндуцированных хемилюминесценций лейкоцитов человека.

*Работа по данной статье поддержана ООО «Центр доктора Плетнева».*

## Литература

1. Плетнев В.В. Капли Плетнева, обладающие противовоспалительным действием. Патент РФ на изобретение №2589262, 2015.
2. Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection and immunity: an overview. *Nutr Rev.* 2002; №60: 40-45. doi: 10.1301/00296640260130722.
3. Chandra R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr.* 2002; №56: 73-76. doi:10.1038/sj.ejcn.1601492.
4. Gladyshev V.N. Selenium in biology and human health: controversies and perspectives. In *Selenium: its molecular*

*biology and role in human health.* Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass. 2001: 313-317. doi: 10.1007/978-1-4615-1609-5\_25.

5. Huang K., Yang A. Inhibitory effect of selenium on *Cryptosporidium parvum* infection in vitro and in vivo. *Biol Trace Elem Res.* 2002; 90: 261-72. doi: 10.1385/BTER:90:1-3:261.
6. Langkamp-Henken B., Bender B.S., Gardner E.M., et al. Nutritional formula enhanced immune function and reduced days of symptoms of upper respiratory tract infection in seniors. *J Am Geriatr Soc.* 2004; №52: 3-12. doi: 10.1111/j.1532-5415.2004.52003.x.

## Сведения об авторах:

Плетнев Владимир Владимирович – кандидат медицинских наук, врач-онколог, клинический фармаколог, генеральный директор ООО «Центр доктора Плетнева», Москва 115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24, e-mail: pletnevtreatment@mail.ru.

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клинической иммунологии Института иммунологии, Москва

Поступила 9.01.2017 г.

УДК: 616.831-005.4-036.12-085

DOI: 10.14427/jipai.2017.1.25

## Иммуномодуляторы и антиоксиданты в коррекции иммунных и оксидантных нарушений при хронической ишемии мозга

А.А. Шульгинова<sup>1</sup>, Н.А. Быстрова<sup>1</sup>, А.В. Караулов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Курск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва, Россия

## Immunomodulators and antioxidants in correction of immune and oxidant disturbances at the chronic ischemia of the brain

A.A. Shulginova<sup>1</sup>, N.A. Bystrova<sup>1</sup>, A.V. Karaulov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FSBI of the HE «Kursk state medical university» of the Russian Ministry of Health, Kursk, Russia

<sup>2</sup> FSBI of the HE «First Moscow state medical university of name I.M. Sechenov» of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

## Аннотация

Цель: установить эффективность Мексикора и Глутоксима в коррекции иммунных и оксидантных нарушений при хронической ишемии мозга I и II стадии.

Методы: клиническое исследование, определение показателей иммунного и оксидантного статуса в плазме крови и эритроцитах.

Результаты: перед началом лечения при I и II стадии заболевания установлено повышение уровня про- и провоспалительных цитокинов, увеличение активности кислородзависимых систем нейтрофилов, развитие оксидантного стресса. После проведенного курса фармакотерапии, включавшего препараты антигипертензивного, метаболического, ноотропного и антиоксидантного действия (Мексикор), установлена нормализация 30,4% и коррекция в сторону здоровых доноров 56,5% лабораторных показателей при I и соответственно 36,0% и 44,0% при II стадии заболевания.

Выводы: эффективность включения Глутоксима оказалась выше.

## Ключевые слова

Хроническая ишемия мозга I и II стадии, иммунные и оксидантные нарушения, Мексикор, Глутоксим.

## Введение

Увеличение продолжительности жизни, как следствие старение населения в совокупности с ухудшением экологии с каждым годом при-

## Summary

Objective: To establish the efficacy and Mexicor Glutoxim correction of immune and oxidant disturbances in chronic brain ischemia stage I and II.

Methods: The clinical study, the definition of immune and oxidative status in the blood plasma and erythrocytes.

Results: Before treatment of stage I and II disease found an increase in the level of pro- and anti-inflammatory cytokines, increased activity of neutrophils oxygen-systems, the development of oxidative stress. After a course of drug therapy that included antihypertensive drugs, metabolic, nootropic and antioxidant activity (Mexicor), set the normalization of 30.4% and the correction in the direction of healthy donors were 56.5% in laboratory parameters with the I and respectively 36.0% and 44.0% with stage II disease.

Conclusions: The effectiveness of the inclusion of Glutoxim was higher.

## Keywords:

Chronic cerebral ischemia stage I and II, immune and oxidant disturbances, Mexicor, Glutoxim.

водит к росту во всем мире, в том числе и в РФ, пациентов с острой и хронической цереброваскулярной патологией, что является серьезной медико-социальной и экономической проблемой.