

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНИБУТА В УСЛОВИЯХ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОГО ИММУННОГО СТРЕССА

М. А. Самоотруева¹, И. Н. Тюренков², Д. Л. Теплый³, Н. Р. Кулешевская¹, Е. Б. Хлебцова¹

На модели иммунного стресса, вызванного введением липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa*, показано иммунорегулирующее действие фенибута. Изучена степень выраженности специфического (в реакциях гиперчувствительности замедленного типа и пассивной гемагглютинации) и неспецифического (фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови) звеньев иммуногенеза. Формирование ЛПС-индуцированного иммунного стресса характеризуется увеличением указанных параметров иммунитета. Установлено, что фенибут (при внутрибрюшинном введении в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней) устраняет явления гиперреактивности клеточного звена иммунитета, а также восстанавливает количество фагоцитирующих клеток, что свидетельствует о проявлении препаратом иммунокорректирующих свойств в условиях гипериммунизации.

Ключевые слова: фенибут, иммунорегуляция, иммунокоррекция, иммунный стресс

ВВЕДЕНИЕ

В ранее выполненных нами исследованиях была показана способность психотропного средства фенибута проявлять модулирующий эффект в отношении гуморального и клеточного звеньев иммунного ответа в условиях циклофосамидиндуцированной иммунодепрессии. Наиболее выраженный эффект препарат демонстрирует в дозе 25 мг/кг при применении в индуктивную фазу иммуногенеза и одновременно с индукцией иммунопатологии [3, 4]. Возникает вопрос, не обладает ли фенибут иммунокорректирующей активностью в условиях моделирования иммунного стресса (гипериммунизации).

В последние годы многими исследователями прослежена общая закономерность: чрезмерная активация иммунитета, не несущая положительной биологической функции (как это бывает в условиях инфицирования организма), сопряжена с метаболическим (окислительным) взрывом, в результате чего образуется избыток токсичных супероксидных радикалов, обуславливающих повреждение клеточных мембран, в том числе нейрональных. Кроме того, неконтролируемая высокая активность иммунной системы может сопровождаться гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, изменение биосинтеза которых в той или иной мере может определять и характеризовать патогенез ряда заболеваний ЦНС [1, 2, 6].

В связи с вышесказанным, считаем актуальным изучение регулирующего действия фенибута на специфическое и неспецифическое звенья иммуногенеза в условиях ЛПС-индуцированного иммунного стресса, что и явилось целью настоящей работы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 5–6-месячных 90 крысах линии Вистар обоего пола. Всех животных содержали в условиях вивария на стандартном пищевом рационе в естественном 12-часовом свето-темновом режиме. Животных распределяли по 10 особей в группе для каждого эксперимента. Контролем 1 служили животные, получавшие физиологический раствор в эквивалентном объеме. Контролем 2 — животные с иммунным стрессом, индуцированным внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС) *Pseudomonas aeruginosa* в дозе 100 мкг/кг (1 раз в сутки, 3 дня). Животные опытной группы с иммунным стрессом получали фенибут (внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней).

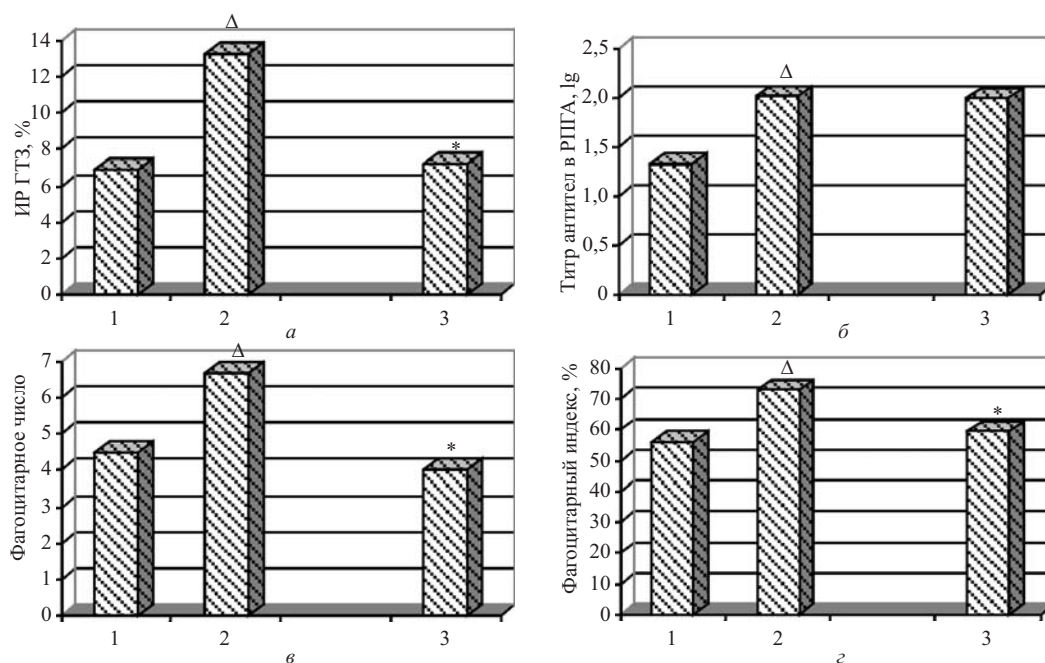
Для оценки иммунорегуляторного действия фенибута в условиях иммунного стресса проанализировали его влияние на клеточное и гуморальное звенья иммунного ответа, а также на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови.

Изучение влияния фенибута на клеточное звено иммуногенеза в условиях иммунного стресса проводили на основе реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [5]. Иммунизацию животных всех групп проводили эритроцитами барана (ЭБ) однократно подкожно $1 \cdot 10^7$ в объеме 100 мкл. Разрешающую дозу антигена ($1 \cdot 10^8$ ЭБ в объеме 20 мкл) вводили на 5-й день после сенсibilизации под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей (“опытная” лапа), в контралатеральную (“контрольную”) лапу — физиологический раствор. Учет интенсивности мест-

¹ Кафедра фармакогнозии с курсом фармацевтической технологии и биотехнологии (зав. — Е. Б. Хлебцова), ГОУ ВПО “Астраханская государственная медицинская академия Росздрава”, Астрахань, 414000, ул. Бакинская, 121.

² Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ (зав. — проф. И. Н. Тюренков), ГОУ ВПО “Волгоградский государственный медицинский университет Росздрава”, Волгоград, 400131, пл. Павших борцов, 1.

³ Кафедра физиологии и морфологии человека и животных (зав. — проф. Д. Л. Теплый) ГОУ ВПО “Астраханский государственный университет”, Астрахань, 414000, пл. Шаумяна, 1.



Влияние фенибута на формирование реакции ГЗТ, РПГА и фагоцитарную активность нейтрофилов в условиях иммунного стресса, вызванного введением ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*.

1 — Контроль 1 (физиораствор); 2 — контроль 2 (физиораствор + ЛПС (100 мкг/кг)); 3 — фенибут (25 мг/кг) + ЛПС (100 мкг/кг).

^Δ и * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем 1 и контролем 2 соответственно;

ИР ГЗТ — индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа, РПГА — реакция прямой гемагглютинации, ЛПС — липополисахарид *Pseudomonas aeruginosa*.

ной реакции проводили через 24 ч, подсчитывая индекс реакции ГЗТ (ИР) по формуле: $ИР = (M_o - M_k) / M_k \times 100 \%$, где M_o — масса “опытной” лапы, M_k — масса “контрольной” лапы.

Изучение влияния фенибута на гуморальное звено иммунного ответа на ЭБ в условиях иммунного стресса осуществляли на основе реакции прямой гемагглютинации (РПГА) [5]. Антигенную стимуляцию осуществляли однократным внутрибрюшинным введением ЭБ в дозе $5 \cdot 10^8$. Через 7 дней после иммунизации животных выводили из эксперимента и получали сыворотку. РПГА для подавления неспецифического связывания антител проводили в 50 мкл 0,5 % раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma), где последовательно двукратно разводили исследуемые сыворотки с добавлением 25 мкл 1 % взвеси ЭБ. Предварительный учет результатов РПГА проводили через 1 ч инкубации при 37 °С, реакцию учитывали окончательно через 18 ч (температура 4 °С). Титр антител выражали в среднегеометрических показателях.

Для изучения влияния фенибута на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови использовали латексный тест [5]. Выведение животных из опыта проводили также через сутки после введения изучаемого вещества. Источником нейтрофилов являлась гепаринизированная кровь используемых в работе животных. После центрифугирования 0,5 мл крови (1500 об/мин, 5 мин) к осадку добавляли 1 мл 1 % раствора желатина, приготовленного на среде 199. По-

сле инкубации (37 °С, 30 мин) надосадочную жидкость с 2 мл среды 199 центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин) с последующим добавлением еще 0,5 мл среды 199. Полученную взвесь элементов белой крови использовали для постановки реакции фагоцитоза. В качестве тест-объекта использовали меланово-формальдегидные латексы размером 1,5–2 мкм (“МинМедБиопром”, Россия). Латекс предварительно трехкратно отмывали физиораствором (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 (37 °С, 30 мин) сделанные мазки фиксировали в этаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе. О фагоцитарной активности нейтрофилов судили по следующим показателям: фагоцитарный индекс или процент фагоцитоза (количество нейтрофилов с латексом из 100); фагоцитарное число (кол-во частиц латекса/100).

Исследование проводили в соответствии с существующими международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [7]. Результаты обработаны статистически с использованием программы “STATGRAPH” с применением t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование ЛПС-индуцированного иммунного стресса характеризуется увеличением следующих параметров иммуногенеза: ИР ГЗТ — более чем в 2 раза, титра антител в РПГА — в 1,8 раза; показатели фагоцитоза — более чем на 25 % по сравнению с показателями “нормы” в контроле 1.

Как видно из представленного рисунка, а, фенибут при внутрибрюшинном введении в дозе 25 мг/кг в течение 5 дней устраняет явления гиперреактивности клеточного звена иммунитета, что проявляется снижением ИР ГЗТ более чем на 70 % по сравнению с группой животных с иммунопатологией ($p < 0,05$). На рисунке в и г продемонстрировано иммуномодулирующее действие фенибута в отношении неспецифической иммунореактивности: параметры, отражающие интенсивность фагоцитоза (фагоцитарное число) и количество клеток, участвующих в фагоцитозе (фагоцитарный индекс) у животных с иммунным стрессом на фоне введения фенибута восстанавливаются, снижаясь в сравнении с контролем 2 более чем на 50 % ($p < 0,05$) и достигая фоновых показателей в контроле 1. Восстановления гуморальной иммунореактивности у животных с иммунным стрессом под влиянием фенибута не наблюдается: титр антител в РПГА остается на уровне значений в контроле 2 (рисунок, б).

ВЫВОДЫ

1. Фенибут, при применении в условиях ЛПС-индуцированного иммунного стресса, проявляет иммунорегулирующее действие.

2. Фенибут устраняет явления гиперреактивности клеточного звена иммунитета, практически не оказывая влияния на процесс антителообразования.

3. Фенибут проявляет фагоцитоз-корректирующие свойства, восстанавливая активность неспецифического звена иммуногенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Александровский, В. П. Чехонин, *Клиническая иммунология пограничных психических расстройств*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2005).
2. О. Е. Зубарева, И. Н. Абдурасулова, И. Н. Краснова, А. М. Клименко, *Нейрохимия*, № 4, 362 – 369 (1997).
3. М. А. Самотруева, А. Н. Овчарова, И. Н. Тюренков, *Вестник новых мед. технологий*, № 3, 168 – 169 (2008).
4. И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, *Бюл. exper. биол.*, № 5, 536 – 539 (2009).
5. Р. М. Хаитов, И. С. Гушин, Б. В. Пинегин и др., *Руководство по экспериментальному доклиническому изучению фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005).
6. В. А. Черешнев, Б. Г. Юшков, В. Г. Климин, Е. В. Лебедева, *Имунофизиология*, УрО РАН, Екатеринбург (2002).
7. Directive 2004 / 10 / EC on the principles of GLP.

Поступила 08.12.09

IMMUNE-REGULATING EFFECT OF PHENIBUT UNDER LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED IMMUNE STRESS CONDITIONS

M. A. Samotrueva¹, I. N. Tyurenkov², D. L. Teplyi³, N. R. Kuleshevskaya¹, and E. B. Khlebtsova¹

¹ Pharmacognosics Chair, Astrakhan State Medical Academy, Bakinskaya ul. 121, Astrakhan, 414000, Russia

² Pharmacology and Biopharmacy Chair, Department of Postgraduate Medical Training, Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov la, Volgograd, 400131, Russia

³ Human Physiology and Morphology Chair, Astrakhan State University, pl. Shaumyana 1, Astrakhan, 414000, Russia

The immunoregulating effect of phenibut has been demonstrated on the model of immune stress caused by the injection of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. The degree of expression of the specific (in a delayed-type hypersensitivity reaction and passive hemagglutination) and nonspecific (phagocytic activity of neutrophils) links of immunomodulation was studied. The formation of lipopolysaccharide (LPS) induced immune stress is characterized by the increase of the indicated parameters of immunity. It is found that phenibut (under intraabdominal injection of 25 mg/kg within 5 days) removes the manifestations of hyperreactivity of the cellular link of immunity, and also restores the amount of phagocytic cells, which is evidence of the immunomodulating properties of the drug under conditions of hyperimmunization.

Key words: Phenibut, immunoregulation, immunocorrection, lipopolysaccharide, immune stress