

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO* ПОД ДЕЙСТВИЕМ СУБСТАНЦИИ ЛЕКТИНОВ ЦЕТРАРИИ ИСЛАНДСКОЙ (*CETRARIA ISLANDICA* L.)

Мацинович А.А.¹, Красочко П.П.¹, Таганович² А.Д., Девина Е.А.², Анисович М.В.³,
Афонин В.Ю.³, Огурцова С.Э.³, Грищенко Е.Р.⁴, Канделинская О.Л.⁴, Белый П.Н.⁵.

¹Витебская государственная академия ветеринарной медицины,
Витебск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

³ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

⁴ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

⁵ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение. Снижение функциональной активности иммунной системы человека и животных, обусловленное различными причинами, – от наследственных нарушений генетического контроля иммунного ответа до воздействия неблагоприятных факторов среды, - актуализирует необходимость проведения адекватной терапии, ориентированной на использовании комплексного подхода. При этом предполагается применение не только синтетических лекарственных средств, но и препаратов растительного происхождения, что обеспечивает более высокую эффективность базовой терапии.

Известно, что лекарственные растения дикорастущей и культурной флоры Беларуси обладают широким спектром физиологически активных веществ, в том числе тех, которые характеризуются иммуномодулирующим действием (фенольные соединения, витамины и некоторые другие). Вместе с тем, обнаруживаемые в составе лекарственных растений белки изучены недостаточно. Это относится, в частности, к гликопротеинам семейства фитолектинов, которые, обладая углеводсвязывающими сайтами, способны избирательно связываться с углеводными детерминантами клеточных структур мембран. Среди многих функций лектинов их иммуномодулирующее действие является одним из наиболее известных. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что применение лектинсодержащих лекарственных растений в составе растительных сборов не только сокращает длительность базовой терапии, но и повышает ее эффективность. В этой связи актуализируется поиск и исследование лектинов в составе лекарственных растений, разрешенных Минздравом РБ для использования в качестве иммуномодуляторов. Подобный подход позволяет выявить новые компоненты растений, ответственных за реализацию их общего фармакологического эффекта, и использовать полученные результаты для разработки эффективных растительных субстанций.

Лишайник цетрария исландская – *Cetraria Islandica* L. семейства Пармелиевые – *Parmeliaceae* широко применяется в медицине как самостоятельно, так и в составе растительных сборов благодаря тому, что содержит комплекс биологически активных веществ - полисахаридов, лишайниковых кислот, микроэлементов, стероидов, органических кислот трикарбонового цикла, ферментов и др. Содержание белка в слоевище достигает 3%. Однако до настоящего времени его компонентный состав практически не изучен. Особенно это касается фитолектинов, которые, помимо участия в симбиозе между фито- и микобионтом, могут обладать иммуномодулирующим действием.

Целью наших исследований являлась оценка в модельных опытах *in vitro* и *in vivo* влияния субстанции лектинов цетрарии исландской на показатели функциональной активности иммунной системы животных и человека.

Материалы и методы. Получение субстанций лектинов из цетрарии осуществляли по разработанной нами методике. На каждом этапе выделения проводили оценку гемагглютинирующей активности лектинов в составе субстанции по реакции агглютинации

трипсинизированных эритроцитов кролика общепринятым методом. Гемагглютинирующую активность лектинов (ГА) выражали в величинах, обратных минимальной концентрации белка, при которой отмечали реакцию гемагглютинации.

Для изучения действия субстанций лектинов на функциональную активность альвеолярных макрофагов (АМ) использовали клетки, которые получали из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости крыс линии Wistar стандартными методами. Общее количество клеток подсчитывалось в камере Горяева. Для определения активности фагоцитоза в среду культивирования АМ вносили субстанцию лектина *Cetrariaislandica* в определенной концентрации помещали в CO₂-инкубатор (температура 37°C, увлажненная атмосфера, 5% CO₂) на 2 ч, после чего к клеткам добавляли бактериальную суспензию *Staphylococcus aureus*. Через 1 ч жидкая фаза удалялась водоструйным насосом, клетки промывались изотоническим раствором NaCl, фиксировались метанолом и окрашивались по Романовскому-Гимзе. Фагоцитарный показатель (ФП) определялся как процент фагоцитирующих клеток из числа сосчитанных макрофагов; фагоцитарное число (ФЧ) — как среднее число микроорганизмов, поглощенных одним активным АМ. Число подсчитанных АМ было ≥ 100 .

Для оценки влияния исследуемой субстанции лектинов цетрарии на состояние иммунной системы использовались нагрузочные тесты [1]. Изучение влияния субстанции лектинов цетрарии на гуморальный иммунный ответ проводили с помощью определения уровня специфических антител у лабораторных белых мышей через 14 дней после введения внутрибрюшинно антигенов совместно с субстанцией лектинов цетрарии. В качестве антигенов использовали эритроциты барана и непатогенный штамм *E. coli* [2, 3].

Оценку острой токсичности субстанции лектинов цетрарии проводили в модельных опытах *in vivo* на лабораторных мышах линии ICR после однократного перорального введения субстанции лектинов цетрарии в дозе 5000 мг/кг. Исследовали показатели массы тела, относительные коэффициенты массы внутренних органов. Анализировали также молекулярно-генетические показатели ploидности клеток крови, костного мозга, тимуса, селезенки мышей; клеточного цикла, частоту клеток с микроядрами и апоптоз на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 («Beckman Coulter»). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Excel. Результаты представлены как среднее арифметическое значение плюс/минус стандартная ошибка среднего для выборки.

Результаты. Установлено, что субстанция лектинов цетрарии оказывала стимулирующее действие на фагоцитарную активность АМ, имеющее характер тенденции. Вместе с тем, согласно данным нагрузочных тестов, наблюдалось увеличение количество активных Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов, без существенного изменения количества Т-супрессоров. При этом имело место увеличение индекса активности нейтрофилов на 16,4 - 20,4% в зависимости от дозы субстанции. Наблюдалось также увеличение показателя прироста титра антител к *E. coli*.

При проведении патологоанатомического исследования не было отмечено изменений покрова, внешнего вида и структуры органов животных. Относительные коэффициенты массы внутренних органов самцов и самок крыс существенно не изменялись. Внутренние органы были без особенностей. Показано, что через 24 часа после перорального введения ацетата свинца, выбранного в качестве положительного контроля в дозе 3мг/кг, наблюдался достоверный цитотоксический эффект во всех анализируемых органах. Это указывает на чувствительность таких критериев цитотоксичности, как апоптоз и наличие клеток с микроядрами в выбранной нами тест-модели для изучения действия субстанции лектина *Cetraria Islandica* в модельных опытах *in vivo*. Установлено, что изучаемая субстанция не приводила к гибели клеток в костном мозге и крови и не вызывала альтераций в клеточном цикле. Цитофлуориметрический анализ спленоцитов показал, что субстанция вызывала достоверное накопление клеток с микроядрами и клеток в клеточном цикле опытной группы, что подтверждается достоверным уменьшением числа спленоцитов на G₁ стадии. Это

указывает на способность изучаемой субстанции стимулировать лимфоциты к делению и/или приводить к их аресту в клеточном цикле. Анализ тимоцитов также показал увеличения числа клеток с микроядрами после перорального введения субстанции лектинов из цетрарии. При этом необходимо отметить увеличение гибели клеток, регистрируемых как гиподиплоидные апоптотические клетки. Полученные ДНК-тропные и цитотоксические эффекты субстанции можно объяснить специфическим действием лектинов. Выбранная нами доза в 5000 мг/кг соответствует для определения V класса токсичности, что означает «практически нетоксично». Для описания генотоксичности используют меньшие (2000 мг/кг) дозы, если LD50 не удастся установить. Полученные цитотоксические эффекты находятся в рамках нормы реакции тканей, которые могут нивелироваться к 14 суткам.

Заключение. Таким образом, исследуемая субстанция лектинов цетрарии исландской обладает мягким иммуностимулирующим действием. После ее однократного перорального введения в дозе 5000 мг/кг лабораторным крысам гибели животных не отмечено. В ходе патологоанатомического исследования не выявлено патологических изменений внешнего вида и структуры органов. Не отмечено гибели клеток в костном мозге и крови и альтераций в клеточном цикле. Согласно данным цитофлуориметрического анализа, субстанция стимулировала деление лимфоцитов и/или приводил к их аресту в клеточном цикле. Анализ тимоцитов также показал увеличение числа клеток с микроядрами. Отмечено увеличение гибели клеток, регистрируемых как гиподиплоидные апоптотические клетки. Полученные ДНК-тропные и цитотоксические эффекты находятся в рамках нормы реакции тканей, которые нивелируются к 14 суткам. Сделан вывод об отсутствии явных цитотоксических свойств в костном мозге, периферической крови, селезенке и тимусе мышей после перорального введения субстанции лектинов цетрарии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. Учебно-практическое издание. ГЭОТАР-Медиа, 2009 - 800 с.
2. Комплексная лабораторная оценка иммунного статуса: учебно-методическое пособие для практических занятий с врачами клинической лабораторной диагностики / И.А.Новикова [и др.] - Витебск, 2003. - 39с.
3. Клиническая иммунология и аллергология / под редакцией Г. Лолора, Т. Фишера, Д. Адельмана. – М., 2000. – 806с.

FUNCTIONAL STATUS OF ANIMAL IMMUNE SYSTEM IN MODEL EXPERIMENTS *IN VITRO* AND *IN VIVO* UNDER THE INFLUENCE OF *CETRARIA ISLANDICA* LECTINSUBSTANCE

A.A. Macinovich¹, P.P.Krasochko¹, A.D. Taganovich², E.A.Devina², M.V. Anisovich,
V.U.Afonin³, S.E..Ogurtscova³, E.R.Grischenko⁴, O.L.Kandelinskaya⁴, P.N.Bely⁵

It has been studied the effect of *Cetraria islandica* lectinsubstance on the functional status of the immune system of laboratory rats in terms of the activity of pulmonary macrophages, T-helpers and T-suppressors, the level of specific antibodies on 14 days after intraperitoneal administration antigens (the non-pathogenic strain of *E. coli*) in model experiments *in vitro* and *in vivo*. It is established the soft immunostimulatory effects of *Cetraria islandica* lectinsubstance on the various links of immunity. In this case the substance is not toxic for laboratory animals.

Работа выполнения при поддержке гранта БРФФИ № Б13ВТ-023.