

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭФИРНОГО МАСЛА МОНАРДЫ ДУДЧАТОЙ (MONARDA FISTULOZA)

Е.Н. НАУМЕНКО¹
Е.Т. ЖИЛЯКОВА¹
О.О.НОВИКОВ¹
Л.В. КРИЧКОВСКАЯ²
ЕЮ. ТИМОШЕНКО¹
А.Г. СТУПАКОВ

¹⁾ *Белгородский государственный
национальный
исследовательский университет,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85,
Национальный технический
университет, г. Харьков*

*Белгородская государственная сельско-
хозяйственная академия*

E-mail: novikov@bsu.edu.ru

В настоящей статье изложены результаты исследования влияния эфирного масла Монарды дудчатой на первичный и вторичный гуморальный ответ. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о значительном влиянии эфирного масла Монарды дудчатой на иммунную систему. Показана возможность влияния эфирного масла на взаимодействие клеток в первичном иммунном ответе с преимущественно нормализующим эффектом по отношению к высокореагирующим организмам и фенотипической стимуляцией генетически детерминированного сниженного ответа. Установлена возможность стимуляции или подавления в зависимости от схемы введения эфирного масла вторичного антительного иммунного ответа.

Ключевые слова: Монарда дудчатая, эфирное масло, иммунитет

Введение

Несмотря на успехи практической медицины, лечение инфекционно-воспалительных заболеваний продолжает оставаться недостаточно эффективным. Связано это с тем, что используемые лекарственные препараты недостаточно эффективно стимулируют как регенеративные процессы, так и повышение сопротивляемости организма, что связано с уровнем иммунной системы. Иммунитет — это система организма, которая направлена на поддержание генетической целостности клеточного состава живых существ. Функция иммунной системы состоит в поддержании клеточного и антигенного постоянства внутренней среды организма, в охране его индивидуальности [2,3]. В патогенезе инфекционно-воспалительных процессов важную роль играет восприимчивость организма и состояние иммунологических и неспецифических механизмов защиты. Снижение иммунологического состояния всего организма способствует развитию неполноценности защитных сил организма. На этом фоне, обычно, развивается не только инфекция, но и создаются условия для нарушения течения воспалительного и регенеративного процессов. Таким образом, при поиске новых лекарственных агентов целесообразным является изучение их влияния на иммунную систему[6].

Исследование действия эфирного масла Монарды дудчатой на первичный гуморальный иммунный ответ

Цель исследования. Оценить действие эфирного масла Монарды дудчатой в отношении первичного иммунного ответа мышей на тимусзависимый антиген - эритроциты барана (ЭБ).

Методика исследования

Выраженность иммунного ответа оценивали по количеству прямых антителообразующих клеток (АОК) селезенки и легких, уровню антител в сыворотке крови, а также по выраженности кожной реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Количество АОК определяли в гомогенате селезенки или легких методом локального гемолиза в агаровом геле по Эрне. Клеточные суспензии получали с помощью стеклянного гомогенизатора. Суспензию клеток фильтровали через капроновый фильтр и отмывали один раз 5-7 минут при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в охлажденной среде 199 и подсчитывали количество ядросодержащих клеток в камере Горяева. Число АОК рассчитывали на 16 ядросодержащих клеток.

Уровень антител определяли в декомплементированной прогретой при 56°C в течение 30 минут сыворотке крови. Антитела против ЭБ определяли в реакции гемагглютинации методом двукратных разведений в лунках полистироловых агглютинационных планшетов [4].

Результаты исследования

В данных условиях опытов внутривенная иммунизация мышей СВА эритроцитами барана в дозе 10⁶ или 10⁹ сопровождалась заметным уровнем первичного иммунного ответа, регистрируемого на 5 день. Число прямых АОК в селезенке мышей контрольной группы (т.е. не подвергавшихся воздействию эфирного масла) составляло в среднем 175±69-252±36 на 10⁶ ядродержащих клеток, уровень антител в крови колебался от 2,8±0,2 до 8,8±0,58.

Внутрибрюшинное введение мышам 0,5% водной эмульсии эфирного масла Монарды вызывало в ряде случаев изменение выраженного первичного иммунного ответа, причем характер изменений зависел от исходного (контрольного) уровня ответа, который в свою очередь, определялся дозой антигена и тем, как линия мышей использовалась - высокореагирующая на ЭБ (СВА) или реагирующая слабее (Ва1в/с).

При достаточно высоком контрольном уровне первичного ответа по АОК (более высокая доза антигена, мыши СВА) трехкратное внутрибрюшинное введение эмульсии масла Монарды до иммунизации в дни - 3, 2, 1 приводило к значимому уменьшению числа прямых АОК в селезенке (с 225±36 до 105±27 на 10⁶ ядродержащих клеток). Введение этого же масла в дни 0,+1, либо в дни +2, +3 практически не сказывалось на числе АОК, образующихся в ответ на иммунизацию (256±75 и 225±44 соответственно), но вызывало значимое повышение уровня антиэритроцитарных антител в крови в случае их низкого исходного уровня (таблица 1).

Таблица 1

Первичный иммунный ответ мышей на ЭБ под влиянием внутрибрюшинного введения эфирного масла Монарды дудчатой

Линия мышей	Показатели	Нормальные животные	Иммунный ответ у мышей, которым вводили масло Монарды, дни введения по отношению к иммунизации			
			-5-4-3	-3-2-1	0+1	-2-3
СВА	АОК	252±36	-	105±27*	256±75	225±44
	АТ	2.8±0.2	-	2.5±0.5	4.4±0.5*	4.25±0.25
Ва 1 в/с	АОК	79±16	-	105±31	183±47	-
	АТ	1.8±0.41	-	2.4±0.24	3.8±0.5*	-
СВА	АОК	221±42	302±36	-	-	-
	АТ	6±0.001	6.2±0.075	-	-	-
СВА	АОК	175±69	-	246±54	139±30	172±42
	АТ	8.8±0.58	-	7.2±0.58	8.4±0.67	7.4±0.39

Примечание: **p* < 0,05 приведен уровень значимости с соответствующими параметрами у интактных животных/

При среднем контрольном уровне первичного иммунного ответа внутрибрюшинное введение 0.5% водной эмульсии эфирного масла Монарды независимо от временного отношения ко дню иммунизации не сказывалось ни на числе АОК, ни на уровень антител в крови.

Вместе с тем, когда в опыт брали мышей низкореагирующих на ЭБ линии - Ва1в/с, то оказалось, что введение эфирного масла Монарды, особенно одновременно с иммунизацией (в дни 0±1), приводило к значимой стимуляции образования прямых АОК и повышению уровня антиэритроцитарных антител.

Исследование действия эфирного масла Монарды дудчатой на вторичный гуморальный иммунный ответ

Приведенные выше данные о влиянии эфирного масла Монарды на первичный иммунный ответ важны в плане выявления возможности действия эфирного масла Монарды на иммунокомпетентные клетки в условиях целостного организма, для вы-

явления основной направленности этого действия и для определения в какой-то возможной мере его механизма. Более практическое значение имеет, на наш взгляд, изучение влияния эфирного масла на вторичный гуморальный иммунный ответ, поскольку именно этот вид иммунного ответа играет основную роль в защите организма от бактериальной инфекции [6].

Цель исследования. Изучение влияние эфирного масла Монарды в отношении иммунного ответа кроликов на растворимый тимусзависимый белковый антиген - бычий сывороточный альбумин (БСА), а также на стафилококковакцину в условиях длительной иммунизации при различной продолжительности и при разных схемах введения масла [4,5].

Методика исследования

В опытах на кроликах для оценки вторичного иммунного ответа БСА по 1 мг в 0,1 мл физиологического раствора вводили интраконъюнктивально во внутреннюю поверхность верхнего века обеих глаз поочередно в течение 8 дней (дни 0, +12, +2, +3, +4, +7, +8, +9, +10) и один раз внутримышечно (день +14)-10,0 мг БСА. Забор крови для определения уровня антител, а также кожные пробы проводили после последней инъекции БСА (день 22 от начала иммунизации).

Антистафилококковые антитела определяли в реакции пассивной гемагглютинации с нагрузкой на формализированные, танализированные эритроциты барана (ЭБ) водно-солевого экстракта отмытой взвеси суточной культуры патогенного стафилококка штамм 209.

Антитела против БСА определяли также в реакции пассивной гемагглютинации с эритроцитами, нагруженными БСА. Уровень антител к БСА при изучении вторичного ответа выражали в степенях двукратных разведений, начиная с 1:10. Титром антител считали последнее разведение, дающее достаточно выраженную агглютинацию. Кроме того, оценивали уровень антител к БСА у кроликов путем постановки кожных проб, для чего вводили 1 мл раствора БСА внутрикожно и учитывали результат спустя 8-12 часов по пятибальной системе в которой пятью баллами обозначали наличие некроза в месте введения БСА, а нулем - отсутствие реакции.

Масло Монарды дудчатой в этих опытах использовали в виде 1% эмульсии на твине-80 и вводили кроликам внутримышечно по 0,5 мл (т.е. по 2 мг/кг) в течение 3-х последних дней первой группы в дни -6, -5, -4 по отношению к первому дню иммунизации, кроликам второй группы - в дни 0, +1, +2, и кроликам третьей группы - в дни +14, +15, +16. Контрольную группу животных иммунизировали БСА по вышеописанной схеме, но без каких-либо дополнительных воздействий.

В другой серии опытов оценивали прямое адьювантное действие масла Монарды при введении его в смеси с антигеном. Для этого кроликов иммунизировали формол-вакциной, приготовленной из суточной культуры *Staphylococcus aureus* 209. Схема иммунизации включала 5 внутримышечных инъекций, проводимых через день в течение двух недель, 3 внутрибрюшинные и 3 внутривенные инъекции также через день в течение 2-3 недель. Масло Монарды в виде 0,25% эмульсии на твине-80 вводили непосредственно в смеси с антигеном в равных объемах.

Результаты исследования

Опыты с длительной иммунизацией кроликов БСА показали, что девятикратная интраконъюнктивальная и внутримышечная иммунизации, проводимые в течение 2-х недель, сопровождались появлением в крови достаточно высокого уровня агглютинирующих антител, составляющего в среднем 8 ступеней разведения или 1:1280. Внутрикожная проба с БСА у животных, подвергнутых действию масла Монарды, сопровождалась появлением спустя 8-12 часов после инъекции кожной реакции, оцененной в среднем в $1,44 \pm 0,83$ балла.

Введение иммунизированным кроликам 1% эмульсии масла Монарды трехкратно в дни -6, -5, -4 по отношению к первому дню иммунизации сопровождалось статистически значимым возрастанием титра антител против БСА в ответ на последующую иммунизацию, до $10,83 \pm 0,77$ ступеней разведения. Средний титр антител, выраженный в абсолютных цифрах, увеличился у кроликов этой группы почти в 18 раз, не

менее чем в три раза возросла также выраженность кожной реакции (до $4,3 \pm 0,48$ балла) на введение БСА.

Введение масла Монарды кроликам в первые три дня иммунизации (0,+1,+2) приводило к повышению выработки антител против БСА в 9,2 раза по средним абсолютным величинам титров. Однако, при этом выраженность кожных реакций практически не отличалась от контрольных показателей ($1,7 \pm 0,67$ против $1,44 \pm 0,83$). И, наконец, введение эмульсии масла Монарды дудчатой после окончания иммунизации (до оценки ответа - в дни +14,+15,+16) незначительно увеличивало уровень антител по сравнению с контрольной группой (в два раза по абсолютным величинам титров - до 1:2560 против 1:1280). Выраженность кожных реакций у кроликов этой группы не отличалась от кожных реакций в контрольной группе животных.

Совершенно иные результаты были получены при многократном введении антигена непосредственно в смеси с эмульсией масла Монарды дудчатой. В этих условиях опыта у животных уровень антител к стафилококковому антигену был значительно снижен по сравнению с контрольными цифрами.

В середине цикла иммунизации - через три недели после ее начала титр антистафилококковых антител составлял $7,5 \pm 0,28$ ступеней разведения в подопытной группе против $12,2 \pm 0,58$ в контрольной $p < 0,01$. При оценке антителообразования после окончания иммунизации разница сохранялась, уровень антител у животных, подвергнутых действию Монарды, составлял $5,6 \pm 0,35$ против $9 \pm 0,28$ у кроликов контрольной группы.

Выводы

Результаты исследований показали, что эфирное масло Монарды дудчатой способно оказывать определенное влияние на иммунокомпетентные клетки и их взаимодействие в условиях целостного организма. При этом установлено, что данное масло оказывает в определенной степени нормализующее влияние в отношении уровня первичного иммунного ответа на корпускулярный тимусзависимый антиген, которым является ЭБ. Вместе с тем, этот нормализующий эффект реализовывался в значительной степени в зависимости от времени введения масла относительно иммунизации. Для эфирного масла Монарды дудчатой характерна преимущественная стимуляция антителообразования при введении его после иммунизации и при исходно низком уровне антител.

Кроме того можно отметить, что масло Монарды, оказывая различное действие на число прямых АОК в селезенке, либо стимулировало антителопродукцию к ЭБ в первичном иммунном ответе при их невысоком контрольном уровне, либо не сказывалось на уровне антител, когда титр их у контрольных животных был достаточно высоким. При этом стимулирующее действие масла Монарды проявлялось только при введении его одновременно с антигеном или после иммунизации.

Что касается влияния эфирного масла Монарды на вторичный гуморальный ответ, то в проведенных опытах эфирное масло Монарды оказывало выраженное стимулирующее либо угнетающее действие на вторичный иммунный ответ. Несоответствие с результатами, полученными в опытах при изучении действия масла Монарды на первичный иммунный ответ, когда введение этого масла в сходные сроки по отношению к иммунизации, а именно в дни -5,-4,-3 не сказывалось на уровне ответа, может быть объяснено несколькими вероятными причинами. Возможно, это связано с различием в характере использованных антигенов, корпускулярного в одном случае и растворимого в другом, с различными видами использованных экспериментальных животных (кролики, и мыши). Возможно также, что вторичный иммунный ответ, как более Т-зависимый по сравнению с первичным в большей степени подвержен и регулирующему влиянию предварительного введения масла Монарды. Весьма вероятно также, что эти несоответствия связаны со значительными различиями в дозировке введенного масла - в опытах с влиянием на первичный иммунный ответ использовалась дозировка более чем в тридцать раз превышающая дозу масла Монарды, примененную при изучении влияния на вторичный иммунный ответ (соответственно 70 мг/кг и 2 мг/кг). Сходный эффект был отмечен А.К. Неграш [1], выявившим у некоторых антибиотиков высших растений способность оказывать профилактическое дей-

ствие по отношению к экзотоксину золотистого стафилококка, причем активность указанных препаратов падала с повышением их дозы.

Список литературы

1. Неграш, А. К. Развитие устойчивости у золотистого стафилококка к антибиотикам растительного происхождения и свойства устойчивых вариантов / А. К. Неграш // Фитонциды : роль в биогеоценозах, значение для медицины : материалы VIII совещ. [16-18 окт. 1979 г. / отв. ред Б. Е. Айзенман]. - Киев, 1981. - С. 260-262.
2. Николаевский, В. В. Действие эфирного масла монарды на показатели клеточного и гуморального иммунитета / В. В. Николаевский, В. Н. Александров, В. М. Резванов // Эфирные масла и их использование в здравоохранении и народном хозяйстве : материалы конф., Ялта, дек. 1988 г. / Науч.-координац. совет Крым. обл. Юж. науч. центра АН УССР [и др.] ; редкол.: А. Ф. Гавриленко [и др.]. - Ялта, 1988. - С. 14-15.
3. Николаевский, В. В. Коррекция вторичных иммунодефицитов растительными ароматическими биорегуляторами (РАБ) / В. В. Николаевский, А. Е. Еременко, М. И. Говорун // Селекция, экология, технологии возделывания и переработки нетрадиционных растений : материалы V междунар. науч.-производств. конф. : посвящ. творческому наследию Л. П. Симиренко, Алушта, 9-14 сент. 1996 г. - Симферополь, 1996. - С. 287-289.
4. Хаитов, Р. М. Методические указания по изучению иммунотропной активности фармакологических веществ / Р. М. Хаитов, И. С. Гуцин, Б. В. Пинегин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ : учеб. пособие для системы послевуз. проф. образования врачей / под общ. ред. Р. У. Хабриева. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва, 2005. - С. 501-514.
5. Иммуномодулирующие свойства композиции фенотропила и глутаминовой кислоты / И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, Н. Н. Гражданцева [и др.] // Биомедицина. - 2011. - Т. 1, № 3. - С. 63-69.
6. Клиническая иммунология и аллергология : [руководство] / под ред. Г. Лолора-мл. и др. ; пер. с англ. М. В. Пащенко, Н. Б. Гамалеи. - Москва : Практика, 2000. - 806 с. - (Зарубежные практические руководства по медицине ; № 9).

E.N. NAUMENKO¹
E.T. ZHILYAKOVA¹
O.O. NOVIKOV
L.V. KRICHKOVSKAJ²
E.Y. TIMOSHENKO,
A.G. STUPAKOV

¹⁾ *Belgorod State National
 Research University, 308015,
 Belgorod, Pobeda-str., 85.*

National technical university, Kharkov

In the present article results of research of influence of essential oil of the Bee balm dudchaty on the primary and Tuesday humoral answer are stated. The obtained experimental data testify to considerable influence of essential oil of the Bee balm dudchaty on immune system. Possibility of influence of essential oil on interaction of cages in the primary immune answer with mainly normalizing effect in relation to high-reacting organisms and fenotipichesky stimulation of genetically determined lowered answer is shown. Possibility of stimulation or suppression depending on the scheme of introduction of essential oil of the secondary antitelny immune answer is established

Keywords: Bee balm, essential oil, immunity