

УДК 578.85/86:543.45

- А.П. Левицкий<sup>1</sup>, д.биол.н., проф., чл.-корр. УААН, зам. директора  
И.Г. Маник<sup>2</sup>, СПД (Торговая марка «Жизнь»)  
С.А. Демьяненко<sup>1</sup>, к.м.н.  
В.Т. Гулавский<sup>3</sup>, к.техн.н.  
В.П. Лоцицкий<sup>4</sup>, к.м.н., с.н.с., зав. лаб. биохимии

- <sup>1</sup>ГУ «Институт стоматологии АМН Украины», г. Одесса  
<sup>2</sup>СПД «Маник И.Г.» (торговая марка «Жизнь»), г. Одесса  
<sup>3</sup>Одесская национальная академия пищевых технологий  
<sup>4</sup>ГУ «Одесский противочумный институт МОЗ Украины»

## АНТИВИРУСНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА ИЗ ПРОРОСШИХ ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ

Проросшие зерна пшеницы обладают широким спектром биологического действия, проявляя лечебно-профилактические свойства при экспериментальной патологии (стресс, язва желудка, пародонтит) [4, 7, 8], а также в клинике [5, 10]. Основное количество биологически активных веществ проросших зерен пшеницы представлены, главным образом, полифенолами [9].

Учитывая исключительную роль микробного фактора в этиологии и патогенезе подавляющего числа заболеваний, можно предположить, что и полифенольные соединения проростков пшеницы оказывают своё лечебно-профилактическое действие путем влияния на микробный фактор, в частности, на вирусы.

**Цель работы** — изучить влияние препарата из проростков пшеницы на размножение вируса гриппа и состояние антимикробного иммунитета.

### Материалы и методы исследования

При выполнении работы были использованы беспородные белые мыши 18-26 г; вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1), куриные эмбрионы, препарат (сок) из проростков пшеницы (Биотрит) с концентрацией экстрактивных веществ 4,2 % (производитель и поставщик ростков пшеницы и сока из них — СПД «Маник И.Г.»).

### Вирусологические методы

**Пассирование вируса гриппа на мышцах.** С этой целью животное под легким эфирным наркозом интраназально заражали 0,05 мл аллантоисной жидкости, содержащей вирус. Через 8 часов мышью умерщвляли, стерильно извлекали легкие, растирали их в ступке со стеклом, добавляли физиологический раствор с антибиотиками из расчета 2 мл физиологического раствора на одно легкое. После центрифугирования при 2000 г в течение 10 минут 0,1 мл надосадочной жидкости вводили интраназально другому животному и т.д.

**Накопление вируса гриппа на куриных эмбрионах.** Для этого использовали надосадочную жидкость, полученную из гомогената легких мышей после нескольких пассажей вируса. Заражали 11-дневные куриные эмбрионы в аллантоисную полость 0,2 мл разведенного в логарифмической прогрессии заражающего материала и инкубировали 48 часов при температуре 37 °С. После этого стерильно отсасывали аллантоисную жидкость, в которой определяли титры вируса по данным реакции гемагглютинации (РГА) [1, 2]. Аллантоисную жидкость эмбрионов, титры РГА в которой были равны 1:128 и выше, объединяли и стерильно разливали по 1 мл во флаконы с последующим хранением при -26 °С.

**Титрование инфекционности вируса гриппа на мышцах при интраназальном методе заражения.** В этом случае в каждой группе из 4-6 мышей интраназальное заражение осуществляли под легким эфирным наркозом, используя по 0,05 мл аллантоисной жидкости с содержанием вирусов кратным 10 (1 lg). Наблюдение за животными осуществляли в течение 15 дней, ведя учет гибели, начиная с 1-х суток.

### Иммунологические методы

Гемолитическую активность сыворотки и спленоцитов оценивали спектрофотометрическим методом по количеству связавшихся с антителами и лизированных в присутствии комплемента эритроцитов барана [3]. Число розеткообразующих клеток (РОК) определяли путем подсчета количества лимфоцитов с пятью и более прикрепившимися ксеногенными эритроцитами [14]. Количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке определяли путем подсчета числа зон локального гемолиза в жидкой среде, содержащей эритроциты барана, сенсibilизированные спленоциты и комплемент [11]. Титры гемагглютининов и гемолизинов определяли методом последовательных двукратных разведений с помощью микротитратора Такачи [6]. При изучении гуморального ответа животных иммунизировали внутрибрюшинным введе-

нием многократно отмытых в физрастворе эритроцитов барана в дозе  $5 \times 10^8$  клеток на одну мышь. Исследование проводили на пятые сутки после введения эритроцитов.

Функциональную активность макрофагов оценивали по их способности изменять интенсивность фагоцитоза дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* [12] и восстановления этими клетками нитросинего тетразоля (НСТ-тест) [13].

Расчет  $LD_{50}$  проводили методом Кербера в модификации Ашмарина [1, 2] по формуле:

$$LD_{50} = -lgD_n - d(\sum \lambda_i - 0,5),$$

где  $D_n$  – доза, дающая максимальный эффект;

$\lambda_i$  – отношение числа животных, погибших при заражении данной дозой, к общему числу зараженных этой дозой;

$i$  – номер дозы (минимальную дозу принимают за первую);

$d$  – логарифм кратности разведения.

### Результаты исследований и их обсуждение

Антивирусную активность препарата из проростков пшеницы исследовали на мышах, которым *per os* вводили по 7,2 мг экстрактивных веществ из проростков на мышь в сутки в течение 15 дней до заражения и 15 дней после заражения. Заражение вирусом гриппа осуществляли под легким эфирным наркозом интраназально в дозе 0,05 мл вирусосодержащей жидкости с различными разведениями ( $1 \times 10^{-1}$ ...  $1 \times 10^{-10}$ ). В каждой группе находилось по 6 животных. Гибель учитывали в течение 15 дней после заражения и рассчитывали  $LD_{50}$ .

Предварительно вирус был трижды пропассирован на мышах и затем накапливался в аллантоисной жидкости 11-дневных куриных эмбрионов через 48 часов после их заражения предельными разведениями гомогенатов легких ( $1:10^{-5}$  и  $1:10^{-6}$ ), при этом гемагглютинирующая активность вирусного материала, полученного при заражении эмбрионов, равнялась 1:512.

Анализ динамики гибели мышей, зараженных вирусом гриппа и получавших препарат из проростков пшеницы, представлены на рисунке в виде кумулятивных  $lgLD_{50}$ , свидетельствует о том, что гибель животных в контрольной группе началась на 3-й день, тогда как в опытной на 4-й день.

Начиная с 9-х суток после заражения, гибель животных в опытной группе была достоверно ниже, чем в контрольной. С 11-го и в последующие дни различие в  $lgLD_{50}$  между опытной и контрольной группами составило 1,5 ед.

Таблица 1

Влияние препарата из проростков пшеницы на гуморальный иммунный ответ ( $n = 6-8$ ;  $M \pm m$ )

Вариант	Число РОК среди $10^3$ спленоцитов	Число АОК среди $10^6$ спленоцитов	Гемолитическая активность, $\times 10^6$		Титры, $log_2$	
			спленоцитов	сыворотки	агглютининов	лизинов
1. Интактные животные	$10 \pm 1$	$114 \pm 5$	$3,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$0,37 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,06$
Оптимальная доза антигена						
2. Контроль	$84,3 \pm 3$	$676 \pm 26$	$26,5 \pm 2,5$	$10,2 \pm 0,8$	$9,60 \pm 0,86$	$9,90 \pm 0,90$
3. Препарат	$86,5 \pm 5$	$752 \pm 18^*$	$31,2 \pm 2,2^*$	$10,4 \pm 0,8$	$8,90 \pm 0,82$	$9,30 \pm 0,30$
Субоптимальная доза антигена						
4. Контроль	$25,2 \pm 2$	$200 \pm 26$	$5,2 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,50 \pm 0,19$	$1,95 \pm 0,16$
5. Препарат	$50 \pm 4^*$	$439 \pm 40^*$	$9,1 \pm 0,5^*$	$3,4 \pm 0,3^*$	$3,90 \pm 0,33^*$	$4,70 \pm 0,39^*$
Оптимальная доза антигена+циклофосфан						
6. Контроль	$41 \pm 6$	$343 \pm 36$	$11,3 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,5$	$4,70 \pm 0,60$	$5,40 \pm 0,50$
7. Препарат	$58 \pm 3^*$	$480 \pm 11^*$	$15,4 \pm 0,8^*$	$6,4 \pm 0,2^*$	$6,10 \pm 0,30^*$	$6,90 \pm 0,30^*$

Примечание: \* – различия достоверны по сравнению с контролем данной группы; гемолитическая активность спленоцитов выражена числом эритроцитов барана, лизированных  $10^6$  спленоцитов; гемолитическая активность сыворотки выражена числом эритроцитов барана, лизированных 25 мкл сыворотки.

Снижение  $IgJД_{50}$  свидетельствует о повышении патогенности возбудителя либо о снижении устойчивости организма к инфекции.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что введение препарата из проростков пшеницы повышает устойчивость животных к тяжелым формам гриппозной инфекции более чем в 30 раз.

Динамика гибели животных дает веские основания полагать, что защитное действие препарата в первую очередь обусловлено его иммуностимулирующим и антибактериальным действиями, поскольку статистически значимые различия в гибели животных имели место в поздние сроки, тогда как для прямого антивирусного действия характерны различия в более ранние сроки.

Результаты исследования иммуностимулирующих свойств препарата из проростков пшеницы представлены в табл. 1, из которой

следует, что стимулирующий эффект препарата наиболее отчетливо проявляется на фоне сниженной активности путем введения субоптимальной дозы антигена (эритроцитов барана). При этом отмечается увеличение уровня всех изученных показателей в 2-2,5 раза.

При введении препарата из проростков пшеницы животным, получавшим оптимальную дозу антигена на фоне введения циклофосфана (50 мг/кг), также отмечена способность исследуемого препарата ослаблять иммунодепрессивные эффекты цитостатика.

Результаты исследований влияния препарата из проростков пшеницы на функциональную активность макрофагов представлены в табл. 2. Препарат вводили экспериментальным животным за сутки до взятия крови.

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о значительном возрастании функ-

Таблица 2

Влияние препарата из проростков пшеницы на функциональную активность макрофагов (n = 8; M ± m)

Группа	Интенсивность фагоцитоза	НСТ-тест (мкг дидирмазана на 106 макрофагов)
Контроль	3,3 ± 0,5	11,0 ± 0,8
Препарат из проростков	9,0 ± 1,1 p < 0,001	34,0 ± 2,4 p < 0,001

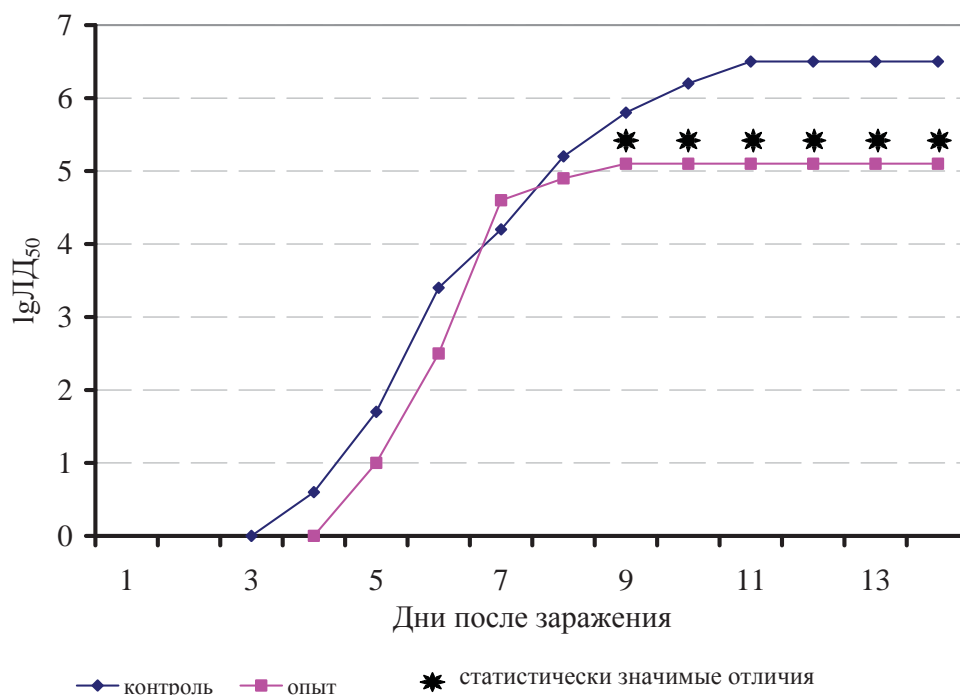


Рис. Влияние препарата из проростков пшеницы на кумулятивный  $IgJД_{50}$  при моделировании у мышей экспериментального гриппа.

циональной активности макрофагов под влиянием исследуемого препарата. В клетках синхронно увеличивается фагоцитарная способность и суммарный уровень окислительно-

восстановительных процессов. Возрастание интенсивности НСТ-теста дает основание предполагать, что препарат из пшеницы стимулирует бактерицидность фагоцитов.

**Выводы**

Подводя итог проведенным исследованиям, можно заключить, что препарат из проростков пшеницы обладает антивирусным и иммуномодулирующим действиями, которые заключаются в способности стимулировать подавленные реакции гуморального иммунитета и активировать фагоцитоз. Это

дает основание рекомендовать препарат из проростков пшеницы в качестве лечебно-профилактического средства при хронических заболеваниях, а также при угнетении иммунной системы, вызываемой введением антибиотиков и под действием различных токсикантов.

**Література**

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Вычисление LD<sub>50</sub> при малом числе подопытных животных // Журн. микробиол. — 1959. — № 2. — С. 102-108.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — М.: Медгиз, 1962. — 125 с.
3. Буркин А.А., Лосев А.. Метод определения гемолитической активности лимфоидных клеток и сыворотки иммунизированных животных для отбора иммунотропных агентов // Хим.-фармац. журн. — 1976. — Т. 10, № 11. — С. 41-45.
4. Вигмор Э. Проростки — пища жизни. — СПб.: ЗАО "Весь", 2000. — 208 с.
5. Волик Н.А., Белоключкая Г.Ф. Новый адаптоген "Биотрит" в комплексном лечении заболеваний пародонта // Вісник стоматол. — 2000. — № 5. — С. 28-30.
6. Иммунологические методы / Под ред. Х. Фримеля. — М.: Мир, 1979. — 520 с.
7. Левицкий А.П., Соловьева В.П., Макаренко О.А. Биотрит — новый пищевой адаптоген из проростков пшеницы. В кн.: "Пища. Экология. Человек" // Тез. докл. междунар. науч.-тех. конф. — М.: МГАПБ, 1995. — С. 118.
8. Левицкий А.П., Макаренко О.А., Соловьева В.П., Вовчук С.В. Технология получения и биологические свойства нового стимулятора Биотрит / В кн.: "Биотехнология: получение кормового белка, экологически чистых препара-
- тов, повышающих урожайность премиксов, ферментов и витаминов кормового назначения" Матер. докл. конф. — Днепропетровск, 1995. — С. 70.
9. Ткаченко Е.К., Багирова Е.А., Протункевич О.О. и др. Флавоноиды Биотрита — лиганды рецепторов гамма-аминомасляной кислоты / В кн.: "Растительные адаптогены" Сб. научн. трудов Одесского отд. УБО. — Одесса: Астропринт, 2000. — С. 32-38.
10. Ben-Arye E., Goldin E., Wengrower D., et al. Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis. A randomized double-blind placebocontrolled trial // Scand. J. Gastroenterol. — 2002. — Vol. 37, № 4. — P. 444-449.
11. Cunningham A., Sceenberg A. Further improvements in the plaque for detecting single antibody-forming cells // Immunology. — 1968. — Vol. 14, № 4. — P. 599-600.
12. Kaminski N.E., Roberts J.F., Guthrie F.E. A rapid spectrophometric method for assessing macrophage activity // Immunol. Lett. — 1985. — Vol. 10, № 6. — P. 329-331.
13. Raichvarg D., Marchand E., Sarfati G., Agneray I. Technique colorimetrique d'evaluation de l'activite phagocytaire des macrophages peritoneaux de souris // Ann. Immunol. — 1980. — Vol. 131, № 1. — P. 71-78.
14. Zaalberg O.B. A simple method for detecting single antibody-forming cells // Nature. — 1969. — Vol. 202, № 8. — P. 1231-1235.

Надійшла до редакції 28.05.2009

**УДК 578.85/86:543.45**

А.П. Левицкий, І.Г. Манік, С.О. Дем'яненко, В.Т. Гулавський, В.П. Лозицкий

**АНТИВІРУСНІ ТА ІМУНОМОДЕЛЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ ПРЕПАРАТУ З ПАРОСТКІВ ПШЕНИЦІ**

**Ключові слова:** паростки пшениці, вірус грипу, імунітет, фагоцитоз.

Препарат із паростків пшениці проявляє антивірусну дію по відношенню до віруса грипу в дослідгах *in vivo* на мишах, стимулює гуморальний імунітет і фагоцитоз.

A.P. Levitskij, I.G. Manik, S.A. Demianenko, V.T. Gulavskij, V.P. Lozitskij

**THE ANTIVIRAL AND IMMUNOMODULATORY CHARACTERISTICS OF THE MEDICINE OF GERMINATING WHEAT SEEDS**

**Key words:** wheat germs, grippe virus, immunity, phagocytosis.

The medicine of the wheat germs possesses the antiviral influence upon the grippe virus at the experiments at mice *in vitro*, stimulates humoral immunity and phagocytosis.

□