

Иммунологические эффекты веществ в сверхмалых дозах: новые механизмы и синергетические взаимодействия*

Б. Бонавида

БЕНДЖАМИН БОНАВИДА (*Bendjamin Bonavida*) — профессор иммунологии Медицинского института, отдел микробиологии и иммунологии, Лос-Анджелес, Калифорния, США.

UCLA School of Medicine, 10833 Le Conte Avenue, Los Angeles, California, 90024, USA, тел. (310)825-22-33, факс (310)206-38-65, E-mail bbonavid@microimmun.medsch.ucla.edu

В большинстве публикаций по биохимическим исследованиям описываются биологические эффекты и молекулярные механизмы действия химических агентов при использовании в их физиологических и субтоксических концентрациях. Область более низких концентраций, как правило, не рассматривается, так как считается, что на этом уровне исследуемые физиологические эффекты не проявляются. Кроме того, немаловажно, что развитие работ, направленных на изучение действия агентов в ультранизких концентрациях, как в их индивидуальном состоянии, так и в комбинации с другими веществами, тормозится из-за необходимости применения высокочувствительных методов анализа.

Отметим, что состояние «ультранизкие концентрации» — это растворы (смеси) в очень высоких разбавлениях, которые все еще содержат какое-то количество исходных молекул вещества. Системы в еще более высоких разбавлениях — до концентраций 10^{-20} — 10^{-22} *M* фактически лишены исходного физического состава. Работы с крайне высокими степенями разбавления биологически активных веществ могут быть отнесены к области гомеопатических исследований. Гомеопатические лекарственные средства варьируют как по их составу, так и по конечной концентрации действующего агента. Некоторые из гомеопатических лекарств имеют определенный, постоянный состав и используются в широком интервале конечных концентраций — от физиологических до ультранизких. Но в большинстве случаев состав гомеопатических средств варьируется, обычно они состоят из большого количества компонентов в различных конечных концентрациях. Такие лекарственные средства проявляют свой биологический эффект скорее всего за счет взаимодействия совокупности химических соединений, присутствующих в смеси.

Отметим, что многие биологические эффекты гомеопатических средств оценивались на основании клинико-биохимических показателей с использованием в качестве критериев специфических клинических симптомов. Однако научное обоснование эффективности гомеопатических препаратов в практической медицине до сих пор является недостаточным и многими ставится под сомнение. В недавно опубликованном сообщении Линде с соавт. о результатах лечения больных гомеопатическими средствами и *placebo* [1] показано, что клинические эффекты гомеопатии не полностью обусловлены *placebo*. Авторы полагают, что строгое и систематическое исследование в области

гомеопатии является чрезвычайно важным научным направлением в современной медицине. И это — курс наших работ, которые мы проводим в течение последнего десятилетия при поддержке Фонда исследований Voiron.

В данной статье представлены исследования по изучению биологических эффектов физиологически активных веществ в ультранизких концентрациях. Главная цель этих исследований — установить и научно обосновать тот факт, что вещества, действующие в концентрациях, гораздо более низких, чем обычные физиологические нормы, могут вызывать по специфическим механизмам биологические эффекты, проявляемые в нормальных и опухолевых тканях. Кроме того, важно было установить вероятность синергизма в случае действия комбинации химических агентов. Значение этой работы очевидно — выяснение биологических и молекулярных механизмов, определяющих природу действия препаратов в ультранизких концентрациях, должно дать основу для их клинического использования, а также позволит выявить новые направления в создании терапевтических средств.

Наша работа включала две главные взаимосвязанные программы: исследование на модельных системах биологических и молекулярных механизмов агентов, используемых в ультранизких концентрациях, и изучение эффектов иммуномодуляции двумя гомеопатическими препаратами на человеческом материале *in vitro*.

I. Исследования биоэффектов на модельных системах. Синергизм при комбинации физиологически активных веществ

Научной предпосылкой этого этапа наших исследований служила выдвинутая нами гипотеза о том, что агенты, действующие в сверхмалых концентрациях, передают сигнал в клетках через иные внутриклеточные пути, чем те же вещества, применяемые в физиологических дозах (рис. 1). Мы также полагаем, что два или более агентов, использованных в комбина-

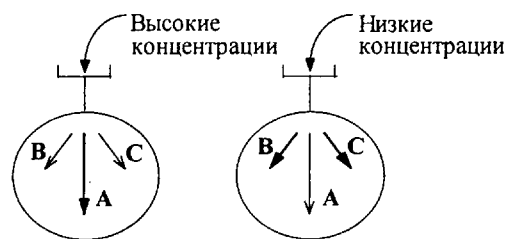


Рис. 1. Сигналы на воздействие высоких и низких концентраций вещества

* Перевод с английского докт. биол. наук Н.П. Пальминой.

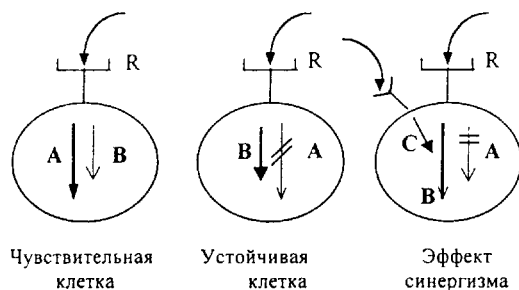


Рис. 2. Схема, поясняющая возникновение синергизма в биологической активности (R — рецептор)

ции в сверхмалых дозах, могут проявлять эффект синергизма (рис. 2).

Модельные системы «действующий агент—био-объект», на которых мы проводили свои исследования, включали цитотоксические агенты, в частности фактор некроза опухоли α -TNF, комплекс цитотоксического лимфоцита с Fas-рецептором (Fas-L), цисплатину, адриамицин, этопозид, и линии опухолевых клеток, чувствительных к этим цитотоксическим агентам. Такие модельные системы позволяют использовать хорошо охарактеризованные очищенные цитотоксические вещества с известным механизмом действия при введении их в физиологических концентрациях.

Опухолевые клеточные линии были выбраны с тем расчетом, чтобы можно было точно и воспроизводимо измерять конечный цитотоксический эффект. Кроме того, принималось во внимание, что линии опухолевых клеток имеют ряд преимуществ по сравнению с другими тканями, а именно, опухолевые клетки, растущие в культуре, одинаково хорошо доступны действующим агентам, что обеспечивает их однотипный ответ на воздействие; линии в культуре растут непрерывно и доступны для использования; выбранные варианты могут быть получены из родительской линии для молекулярного анализа; можно выращивать большое количество опухолевых клеток, чтобы иметь достаточно материала для биохимического и молекулярного анализа; линии опухолевых клеток можно перевести экспериментальным животным (мышам) для перенесения результатов *in vitro* в условия *in vivo*.

Синергетические эффекты цитотоксических агентов в сверхмалых дозах

С использованием выбранных модельных систем были решены две специфические задачи: 1) исследована цитотоксическая активность одного и двух цитотоксических агентов в комбинации при действии их в сверхмалых дозах на опухолевые клеточные линии, 2) проведена оценка возможных биохимических и молекулярных механизмов, лежащих в основе достигаемых биоэффектов.

Перейдем к обсуждению полученных результатов.

Комбинация фактора некроза опухоли TNF с цитостатическими препаратами. Установлено, что обработка клеточных культур, произведенных из опухолей человека, рекомбинантным фактором некроза опухоли TNF в совокупности с химиотерапевтическими препаратами приводит к синергизму в цитотоксической активности. Синергетический эффект был достигнут при действии субтоксических концентраций TNF и таких лекарств, как адриамицин, цисплатина и 5-фторурацил. Опухоли различных гистологических типов (карцинома яичников, легких и меланома) обнаруживали чувствительность к комбинированному

воздействию цитотоксических агентов. Примечательно, что опухолевые клетки, которые устойчивы либо к α -TNF, либо к лекарствам при их индивидуальном воздействии, оказались чувствительными в случае комбинированной обработки, т.е. таким образом преодолевается множественная лекарственная устойчивость. Более того, синергизм в цитотоксическом действии был отмечен и на внутриклеточном уровне, т.е. после транспорта лекарств в опухоли с множественной лекарственной устойчивостью [2—4].

Для выяснения возможных механизмов, лежащих в основе данного проявления синергизма, изучалась чувствительность нескольких линий человеческих опухолей различного гистологического происхождения к α -TNF и адриамицину. Поскольку комбинированная химиотерапия приводит к преодолению лекарственной устойчивости и достижению синергизма, мы предположили, что адриамицин способен понижать уровень комплекса α -TNF-mPHK и белка и создавать клетки, чувствительные к α -TNF. Следовательно, при воздействии на опухолевые клетки, которые синтезируют α -TNF и устойчивы к этому фактору, адриамицин уменьшает конститутивный уровень α -TNF-mPHK и в комбинации с α -TNF снижает выход продуктов TNF. Эти данные наводят на мысль, что снижение уровня α -TNF-mPHK под действием адриамицина может вызывать усиление цитотоксичности, что и отмечено в эксперименте с использованием комбинации из этих двух агентов [5].

Далее мы исследовали эффект комбинированной терапии TNF и адриамицина по отношению к клеткам опухоли, обладающим фенотипом множественной лекарственной устойчивости. На различных линиях опухолевых клеток мы установили, что такая комбинация приводит к усилению цитотоксичности независимо от того, чувствительна или устойчива линия к раздельному воздействию этих цитостатиков. В случае лекарственной невосприимчивости, обусловленной фенотипом множественной лекарственной устойчивости, она может быть преодолена α -TNF и адриамицином. Кроме того, мы установили, что ни α -TNF, ни адриамицин не модулируют фенотип множественной лекарственной устойчивости ни на уровне mPHK, ни на уровне белка. Подобные результаты наблюдались на клеточных линиях почечных карцином.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что синергизм, достигаемый при использовании препаратов в сверхнизких концентрациях, способен преодолевать лекарственную устойчивость, обусловленную различными механизмами [6, 7].

Комбинация α -TNF с бактериальными токсинами. Ранее мы сообщали [8], что дифтерийный токсин (ингибитор синтеза белка) может вызывать направленную клеточную гибель путем апоптоза, подобно действию α -TNF [8]. Наши результаты показали, что два этих цитотоксических агента при действии их совместно в ультранизких концентрациях проявляют синергетический эффект как по отношению к чувствительным, так и устойчивым к химиотерапии клеточным линиям [9].

Чтобы выяснить потенциальный механизм, по которому дифтерийный токсин синергетически взаимодействует с α -TNF, необходимо было установить, какая стадия в цепи ингибирования белка, вызванного действием дифтерийного токсина, важна для индукции цитотоксичности и для синергизма. Мы попытались определить, вовлечена ли опосредованная дифте-

рийным токсином каталитическая активность в процессе адриамицин-рибозилирования фактора элонгации EF-2, которая приводит к ингибированию синтеза белка, в направленный клеточный лизис. Полученные данные показали, что блокирование каталитической активности дифтерийного токсина ведет к аннулированию ДНК-фрагментации и остановке цитолиза. Кроме того, синергетическая каталитическая активность, достигаемая при комбинации дифтерийного токсина и α -TNF, ингибируется при блокировании каталитической активности дифтерийного токсина. На основании этого мы заключили, что апоптоз, опосредованный дифтерийным токсином, использует тот же самый путь адриамицин-рибозилирования EF-2 и включается на стадии, следующей за адриамицин-рибозилированием [10].

Далее мы исследовали роль белковой тирозинкиназы в α -TNF-опосредованных цитотоксичности и апоптозе, используя TNF-чувствительные и устойчивые к TNF линии клеток опухоли яичника. На обеих культурах был выявлен синергизм при использовании α -TNF и дифтерийного токсина в комбинации. Далее мы установили, что генистейн — ингибитор тирозинкиназы не оказывает никакого влияния на цитотоксичность, опосредованную дифтерийным токсином, но ингибирует вызываемую α -TNF цитотоксичность и снимает синергетический эффект α -TNF и дифтерийного токсина по отношению к TNF-чувствительным клеткам яичника, в то же время не влияет на синергизм в TNF-устойчивом варианте. Те же самые результаты наблюдались и в случае клеточного апоптоза.

Эти результаты показывают, что α -TNF-опосредованная цитотоксичность может достигаться по двум разным механизмам, а именно, тирозинкиназа-зависимым и -независимым путями, «выбор» которых определяется степенью используемого разбавления. Однако следует осторожно относиться к этим наблюдениям: агенты, действующие на внутриклеточном уровне, не универсальны и в связи с этим ответная реакция опухолевых клеток может быть существенно иной [9–11].

Комбинация рецепторного белка Fas с лекарствами / токсинами. Как известно, цитотоксической активностью обладают лимфоциты, они вырабатывают антитела (специфические белки), которые способны убивать опухолевые клетки согласно двум механизмам, а именно, по путям *perforin/granzyme* и Fas-L.

Путь Fas-L осуществляется посредством узнавания Fas-рецептора на клетках-мишенях. Fas-рецептор — сложный белок, принадлежащий к семейству α -TNF. Получено антитело на Fas-рецептор — «анти-Fas-антитело», которое является агонистом по отношению к комплексу Fas-L и цитотоксином по отношению к Fas⁺-чувствительным мишеням.

Исследование цитотоксической активности анти-Fas-антитела в комбинации с токсинами (дифтерийный токсин и ризин) и лекарствами (цисплатина, адриамицин), используемыми в сверхнизких дозах, продемонстрировало усиление в данной модели цитотоксичности и эффект синергизма (за исключением комбинации с ризином), а также снятие устойчивости к TNF, лекарствам и токсинам в большом ряду клеточных линий-мишеней. При использовании растительного токсина ризина синергизм с анти-Fas-антителом не обнаруживался, а отмечался только аддитивный эффект.

Клеточные линии, устойчивые к адриамицину и цисплатине и/или экспрессирующие фенотип множественной лекарственной устойчивости, приобретали чувствительность к комбинации лекарств и анти-Fas-антитела. Во всех случаях наблюдалось повышение цитотоксичности, если клетки-мишени предварительно обрабатывали γ -интерфероном, который вызывал нарушения в регуляции экспрессии Fas-антигена. Эти результаты наводят на мысль о том, что возможности иммунотерапии могут быть расширены за счет сенсбилизации клеток к действию цитотоксических агентов, опосредованной через лимфоциты, несущие Fas-L-комплекс [12].

Обнаруженный эффект усиления цитотоксической активности был подтвержден в экспериментах на линиях клеток карциномы яичника, обладающей различной чувствительностью к Fas-белку и лекарствам. Поставленные в рамках изучения механизмов, лежащих в основе наблюдаемых явлений, опыты с обработкой чувствительных и устойчивых к лекарствам опухолевых клеток анти-Fas-антителом и в сочетании с лекарствами показали увеличение цитотоксичности и синергизм.

Факт проявления синергизма при обработке клеток цисплатиной и затем анти-Fas-антителом позволяет полагать, что лекарство сенсбилизует клетки к Fas-опосредованному апоптозу. Это подтверждается снятием синергетического эффекта при нейтрализации анти-Fas-антитела. Цисплатина увеличивает Fas-антенную экспрессию в опухолевых клетках.

Мы показали, что цисплатина проявляет сенсбилизующий эффект к Fas-опосредованному апоптозу по механизму, отличающемуся от того, который действует обычно при непосредственном контакте цитотоксического агента с чувствительными клеточными линиями. Эти результаты открывают новый подход к усилению цитотоксических лимфоцит-опосредованных иммунных взаимодействий в терапии устойчивых опухолей яичника [13] (рис. 3).

Интересные данные получены при исследовании Fas-опосредованной гибели саркомы Капоши и в присутствии актиномицина Д. Саркома Капоши — наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль, связанная со СПИДом (ее патогенез еще не известен).

На трех пробах таких сарком было установлено,

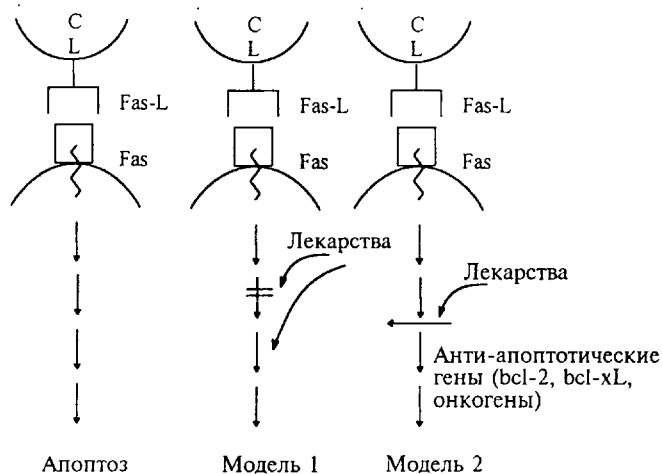


Рис.3. Новые подходы к использованию иммунных взаимодействий, опосредованных цитотоксическими лимфоцитами, в терапии резистентных опухолей яичника.

C — вещество, L — лимфоциты

что, хотя все клетки саркомы Капоши экспрессируют Fas-рецепторы на поверхности клетки, они оказались устойчивыми к цитотоксическим анти-Fas-антителам. Актиномицин Д при лечении саркомы Капоши, связанной со СПИДом, сенсibiliзирует клетки к анти-Fas-антителам, что приводит к повышению цитотоксичности и в итоге к апоптозу.

Были исследованы три возможных механизма, связанные с устойчивостью клеток СПИД-Капоши к анти-Fas-антителам. Во-первых, синтез и секреция опухолевыми клетками растворимого Fas-белка могут нейтрализовать цитотоксичность, индуцируемую антителом, однако большинство клеток не экспрессирует растворимый Fas-белок. Во-вторых, экспрессия проонкогена Bcl-2 может защищать клетки от апоптотических сигналов. Все три изученные нами изолированные типы клеток экспрессировали очень низкие уровни Bcl-2-mРНК. В-третьих, известно, что именно Fas-связанная фосфатаза (FAP) является анти-апоптотической молекулой, которая может блокировать трансдукцию апоптотического сигнала. Все три типа клеток саркомы Капоши имели высокие уровни экспрессии комплекса FAP-1-mРНК, и актиномицин Д значительно уменьшал уровни FAP-1. Эти результаты демонстрируют, что саркомы Капоши, связанные со СПИДом, устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу, и можно полагать, что FAP-1 участвует в приобретении этими клетками устойчивости к апоптозу, опосредованному анти-Fas-антителом [14].

Данные об эффекте Fas-L как агониста анти-Fas-антитела были подтверждены результатами применения Fas-несущих лимфоцитов в иммунотерапии рака. По-видимому, успешная иммунотерапия зависит как от присутствия антиопухолевых лимфоцитов, так и от чувствительности опухолевых клеток к лимфоцит-опосредованной гибели. Это предположение было проверено в экспериментах по определению чувствительности клеток линий рака простаты человека к Fas-L-опосредованной цитотоксичности и сенсibiliзации опухолевых клеток к Fas-L-опосредованному апоптозу в условиях воздействия цитостатиков в ультранизких дозах. Все три изученных линии клеток карциномы простаты оказались устойчивы к Fas-L-опосредованной гибели. Однако добавочное введение в субтоксических дозах цисплатины или этопозиды значительно повышало чувствительность опухолевых клеток к действию Fas-L и вероятность апоптоза Fas-несущими лимфоцитами.

Сенсibiliзация опухолевых клеток лекарствами ингибировалась при нейтрализации анти-Fas-антител. Исследование сенсibiliзации клеток опухоли простаты под действием лимфоцитов, инфильтрующих опухоль, и лимфокин-активированных киллеров показало, что они, как и лекарства, повышают процент гибели Fas⁺-устойчивых клеток опухоли простаты. Эти результаты говорят также о том, что повышенная чувствительность клеток опухоли к субтоксическим концентрациям лекарств открывает новую возможность увеличения эффективности иммунотерапии клеток опухоли, устойчивых к лимфоцит-опосредованной гибели [15].

Молекулярный механизм повышения чувствительности опухолевых клеток под действием γ -интерферона. Предварительно мы сообщали, что γ -интерферон делает чувствительными линии клеток карциномы яичников к Fas-опосредованному апоптозу. Этот белок стимулирует индукцию синтетазы оксида азота (iNOs) и

генерацию NO. Мы исследовали, является ли NO посредником индуцированного интерфероном повышения чувствительности клеток карциномы яичников человека к Fas-опосредованному апоптозу и регулирует ли оксид азота экспрессию Fas-рецептора.

Обработка опухолевых клеток γ -интерфероном вызвала экспрессию iNOs и генерацию NO. Подобно γ -интерферону, экзогенные доноры NO делали опухолевые клетки чувствительными к Fas-опосредованной гибели через апоптоз. Эндогенный оксид азота также нарушает регуляцию экспрессии Fas-рецепторов.

Эти результаты свидетельствуют о том, что сенсibiliзация клеточных линий саркомы яичника человека к Fas-опосредованному апоптозу под действием γ -интерферона может быть частично обусловлена индукцией синтетазы iNOs и последующим нарушением регуляции экспрессии Fas-гена реактивными митохондриальными интермедиатами.

Оценка значимости синергетических биоэффектов. Новые направления в иммунологических исследованиях

Представленные результаты показывают, что цитотоксичность, приводящая к апоптозу, может регулироваться различными неспецифическими агентами эндогенного типа и теми препаратами, которые используются в терапии рака (химиотерапевтические средства, токсины, цитокины, цитотоксические клетки). Более того, исследования свидетельствуют о том, что существуют «переговоры» между различными цитотоксическими агентами и что различные цитотоксические агенты совместно используют внутриклеточные пути, ведущие к апоптозу.

Полученные результаты дают основания полагать, что устойчивость клеток к одному или более агентам может быть преодолена при использовании комбинации препаратов, вводимых в сверхмалых дозах. При комбинированной обработке клеточные сигналы могут передаваться совсем иными путями, чем при раздельном действии любых из этих агентов. Далее, при комбинированной обработке результат лечения может достигаться либо за счет сложения вкладов каждого из агентов в клеточную гибель, либо один агент может вызывать чувствительность клетки к второму агенту и приводить к синергизму.

Данные о гемисенсibiliзации опухолевых клеток сверхнизкими концентрациями лекарств к Fas-опосредованной цитотоксичности позволяют находить новые подходы в иммуно(гено)терапии рака в дополнение к обычно применяемым схемам. Возможность индукции потенциального противоопухолевого ответа основывается на предпосылке, что опухолевые клетки, которые устойчивы к химиотерапевтическим лекарствам, поражаются цитотоксическими лимфоцитами. Однако эта предпосылка, по всей вероятности, не имеет достаточных оснований, поскольку, с одной стороны, клетки опухоли могут быть устойчивы к действию цитотоксических лимфоцитов и, с другой стороны, имеет место селекция резистентных клеток опухоли. В любом случае клетки опухоли продолжают размножаться и не поддаются иммунотерапии. Повышение чувствительности клеток опухоли к действию цитотоксических лимфоцитов может быть достигнуто путем воздействия на клетки субтоксических концентраций цитостатических препаратов.

Другой путь усиления иммунных свойств лимфоцитов — это выявление внутриклеточных мишеней, которые регулируют устойчивость клеток к апоптозу, и создание новых терапевтических средств, непосредственно ингибирующих функцию этих анти-апоптотических генов.

Наши ключевые наблюдения относительно биологических эффектов веществ в сверхмалых дозах позволяют очертить некую схему контакта «действующий агент—биообъект» и лежащие в ее основе молекулярные механизмы. Мы полагаем, что последующие исследования должны быть сосредоточены на определении путей передачи внутриклеточного сигнала, которые активизируются веществами в очень низких концентрациях, и на идентификации новых генных продуктов, вовлеченных в этот процесс. Кроме того, требуется провести анализ молекулярных взаимодействий, реализуемых, когда два агента используются вместе и последовательно. Необходимо выяснить, как эти агенты передают сигнал в клетки и как осуществляются «переговоры» между различными внутриклеточными сигнальными путями.

Наряду с этим необходимо выяснить, по каким путям осуществляется транскрипционная регуляция, которая имеет место на уровне ДНК при высоких разбавлениях действующих агентов, и идентифицировать эти факторы транскрипции. Результаты экспериментов *in vitro* должны быть подтверждены на моделях *in vivo* с переходом к изучению эффектов на уровне сложных структур и целостного организма. Эти новые направления в иммунохимических исследованиях должны стать основой для разработки иных лекарственных схем комплексной терапии с использованием в сверхмалых дозах лекарственных средств.

II. Исследования иммуномодулирующих эффектов гомеопатических препаратов

Нарушение регуляции иммунной системы сопровождается развитием многих заболеваний. В связи с этим нами была поставлена задача изучить эффекты гомеопатических препаратов на иммуно-опосредованные ответы и выяснить основные механизмы этих эффектов.

Природа и результат специфического иммунного ответа, направленного на защиту организма от микробных и вирусных заболеваний, обеспечиваются набором цитокинов, производимых активизированными лимфоцитами. Цитокины, продуцируемые хелперными клетками TH2, ответственны за клеточно-опосредованный иммунитет, а цитокины, продуцируемые хелперными клетками TH1, вырабатывают гуморальные антитела. Далее цитокины регулируют TH1- или TH2-ответы (рис. 4). Селективная регуляция произ-

водства цитокинов гомеопатическими препаратами может быть основанием для их клинического использования в качестве иммуномодулирующих средств.

В своих исследованиях мы исходили из гипотезы, что некоторые гомеопатические препараты могут оказывать эффект иммуномодуляции сами по себе или в комбинации с антигенными препаратами и селективно вызывать TH1- или TH2-опосредованные цитокин-ответы или врожденный иммунный ответ посредством макрофагов и естественных клеточных киллеров.

Изучаемая модельная система включала гомеопатический образец — лекарственную форму фитопрепарата *phytolacca dec* или гидрохлорида гистамина, приготовленную по гомеопатической методике, и моноядерные клетки человеческой периферической крови или очищенные субпопуляции. Клетки выращивали в присутствии и в отсутствие гомеопатических препаратов (конечный объем 1:2) и в присутствии и в отсутствие митогенов. Культуры инкубировали в течение различных периодов времени, супернатанты отделяли от культуральной среды и далее использовали их для анализа цитокинов методом ELISA. Клетки промывали и использовали для анализа клеточно-поверхностной экспрессии методом проточной цитометрии.

Ниже указаны цитокины, которые мы анализировали в выбранных модельных системах: 1) фактор некроза опухоли (α -TNF) — участвует в процессах воспаления, сепсиса и кахексии, цитотоксический агент, участвует в иммунорегуляции; 2) интерлейкин-6 (IL-6) — воспалительный белок, регулирует производство антител; 3) интерлейкин-10 (IL-10) — регулирует производство антител; 4) интерлейкин-12 (IL-12) — регулирует клеточно-опосредованный иммунитет, активизирует естественные клеточные киллеры; 5) γ -интерферон (γ -IFN) — активизирует макрофаги, регулирует иммунный ответ.

Цитокинные профили в периферической крови в присутствии гомеопатических препаратов. В табл. 1 и 2 представлены результаты изучения влияния фитопрепарата *phytolacca dec* и гидрохлорида гистамина на продукцию цитокинов моноядерными клетками периферической крови человека в присутствии и в отсутствие митогенов — фитогемагглютинина (ФГГ) и липополисахарида (ЛПС). Данные показывают, что фитопрепарат *phytolacca dec* и гистамин-гидрохлорид оказывают незначительный эффект на спонтанную продукцию цитокинов, несущественно их влияние и в случае стимулированных клеток периферической крови.

Вместе с тем, иммуномодулирующий эффект менялся в зависимости от донора периферической крови (табл. 3). Результаты анализа модельных систем с клетками периферической крови, взятыми у пяти

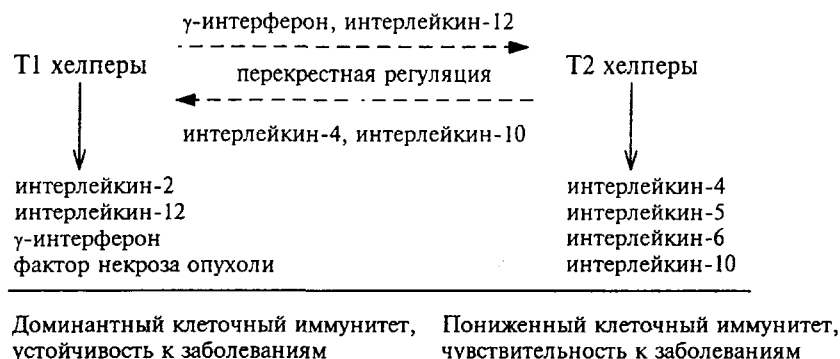


Рис. 4. Схема регуляции цитокинами TH1- и TH2-ответов

Таблица 1

Секреция цитокинов неактивированными и ФГГ-стимулированными моноклональными клетками периферической крови человека, инкубированными с гомеопатическими препаратами

Препарат	Моноциты крови	Секреция цитокина (пг/мл)		
		α -TNF	IL-10	IL-12
<i>Phytolacca</i>	Без активации	4,0± 2	68,6± 0	14,0± 9
Контроль*		1,10	<u>81,4± 3,5 (0,034)</u>	17,0± 1,5
<i>Phytolacca</i>	Активированные	100,0±7	2121± 45	3,8± 0,2
Контроль		120± 8	2012± 169	5,022± 0,6
Гистамин	Без активации	0,14	63,1± 5	12,9± 0
Контроль		6,6	<u>87,0±1 (0,026)</u>	<u>20,3± 2 (0,041)</u>
Гистамин	Активированные	121,0± 8	1962± 161	4561± 1,0
Контроль		125± 3	1916± 310	4407± 1,0

* Лекарственная форма, приготовленная по гомеопатической методике, но без включения действующего начала.

Таблица 2

Секреция цитокинов неактивированными и ЛПС-стимулированными моноклональными клетками периферической крови человека, инкубированными с гомеопатическими препаратами

Препарат	Моноциты крови	Секреция цитокина (пг/мл)		
		α -TNF	IL-10	IL-12
<i>Phytolacca</i>	Без активации	49,2± 4,3	36,1± 4	10,6± 0,2
Контроль		<u>82,1± 3,3 (0,013)</u>	<u>48,7± 0,4 (0,052)</u>	<u>14,7± 0,4 (0,007)</u>
<i>Phytolacca</i>	Активированные	388,0 ± 4	954±12	41,6± 0,4
Контроль		<u>486,0± 40 (0,072)</u>	909± 43	47± 2
Гистамин	Без активации	50± 3,2	49± 2	16± 2
Контроль		60,6± 3	54± 2	<u>20,7± 1 (0,006)</u>
Гистамин	Активированные	327± 20	929± 20	35,4± 4
Контроль		<u>368± 18 (0,072)</u>	980± 75	41

Таблица 3

Секреция цитокинов активированными и ФГГ-стимулированными клетками периферической крови человека, взятой от доноров 1 и 2, инкубированной с гомеопатическими препаратами

Препарат	Моноциты крови	Секреция цитокина (пг/мл)				
		α -TNF	IL-10	IL-12	IL-6	γ -IFN
Д о н о р 1						
<i>Phytolacca</i>	Без активации	277± 70	40,5± 112	2365± 232	1976±121	14,9± 0,9
Контроль		375± 0,25	43,5± 6	2345± 280	<u>1762± 20 (0,08)</u>	<u>18,5± 0,2 (0,03)</u>
<i>Phytolacca</i>	Активированные*	10038± 1732	273± 35	13374± 1074	3431± 218	1778± 290
Контроль		5996±1583	231± 4	<u>8158± 844 (0,03)</u>	3164± 704	1037±166
Гистамин	Без активации	575,5± 30	69± 7	3177± 274	1834± 66	15,9± 5
Контроль		<u>208± 88 (0,03)</u>	<u>29,5± 3,5 (0,02)</u>	2281± 337	1674± 172	11,4± 3
Гистамин	Активированные	12272± 1806	257± 0,7	13726± 1053	2057± 151	2324± 11
Контроль		8995± 74	245	1149± 95	3243± 825	<u>1600± 114 (0,012)</u>
Д о н о р 2						
<i>Phytolacca</i>	Без активации	0	23,7± 5	24,9± 16	359± 66	12,7± 0,6
Контроль		0	21,2± 3	<u>32,6± 3 (0,02)</u>	416± 89	11,8± 1,5
<i>Phytolacca</i>	Активированные	1313± 111	161,5± 3,5	2014± 654	1811± 48	33,2± 6,0
Контроль		1619± 0 (0,06)	235± 34 (0,09)	1775± 193	1827± 222	43,9± 2,1
Гистамин	Без активации	16± 19	44,6± 2	365± 72	506± 98	13,4± 0,4
Контроль		99± 182	34,2± 1	257± 79	175± 4 (0,1)	16,5± 2,3
Гистамин	Активированные	1290± 167	213± 14	1538± 77	1789± 322	38,8± 4,6
Контроль		1289± 56	204± 1,4	1529± 65	2030± 304	64,9± 6,9 (0,04)

* 24 ч стимуляции.

Результаты анализа цитокинов в моноκлональных клетках периферической крови, взятой от пяти доноров, стимулированных митогенами и инкубированных с гомеопатическими препаратами

Указано изменение содержания цитокинов в сравнении с контролем:
 ↑ — увеличение, ↓ — уменьшение

Препарат	Источник клеток	Стимуляция клеток	
		ЛПС	ФГГ
<i>Phytolacca</i>	Донор 1	↑ α-TNF	↓ α-TNF ; ↓ IL-10; ↓ IL-6
	Донор 2	↓ α-TNF	
	Донор 3	↓ α-TNF	↑ IL-12
	Донор 4		↓ α-TNF ; ↓ IL-10
	Донор 5		
Гистамин	Донор 1	↓ α-TNF ; ↓ IL-12	
	Донор 2	↓ α-TNF	
	Донор 3	↑ α-TNF ; ↑ IL-10	
	Донор 4	↑ IL-10	↑ γ-IFN
	Донор 5	↑ α-TNF; ↑ IL-6	↓ γ-IFN

доноров, представлены в обобщенном виде в табл. 4.

Несмотря на вариабельность полученных данных, тем не менее наблюдается некоторая тенденция в регуляции препаратом *phytolacca* TN2-продукции цитокинов с понижением уровня, а в случае ФГГ-стимуляции клеток осуществляется TN1-индукция цитокинов. В модели с митогеном ЛПС и гистамином отмечено повышение уровня цитокинов TN2. Надо признать, что этих данных явно недостаточно, чтобы можно было сделать определенные заключения, необходимы дальнейшие исследования для прояснения наблюдаемой картины.

Влияние гомеопатических препаратов на экспрессию рецепторов на поверхности клеток периферической крови человека. В табл. 5 приведены результаты проточного цитометрического анализа моноцитов человека, выделенных из периферической крови и инкубированных с препаратами в отсутствие митогенной стимуляции.

Анализ полученных данных позволяет предположить, что оба препарата — *Phytolacca* и гистамин-гидрохлорид могут влиять на экспрессию некоторых поверхностных рецепторов на моноцитах. Очевидно, эти рецепторы опосредуют некоторые иммунологические реакции и тем самым играют важную роль в регуляции иммунного ответа на антигены.

Наши исследования являются, по-видимому, первыми, в которых проведена количественная оценка иммуномодулирующего эффекта двух гомеопатических препаратов. Модельные исследования *in vitro* совершенно очевидно продемонстрировали, что эти препараты могут модулировать секрецию цитокинов клетками периферической крови человека, а также влиять на ответ митогенных стимулов. Отсюда можно заключить, что гомеопатические препараты способны регулировать иммунный ответ и иммунную компетентность.

Основываясь на вышеизложенных предварительных данных, можно определенно ска-

зать, что различные гомеопатические препараты будут проявлять неодинаковые иммуномодулирующие эффекты. Наряду с этим некоторые препараты могут быть селективными в иммуномодулирующих эффектах, пример тому — регулирование TN1- и TN2-типов иммунных ответов. Такие регуляторные активности важны для формирования иммунного ответа на инфекции, рак и аутоиммунные заболевания. В дальнейшем мы предполагаем исследовать молекулярную

Таблица 5

Результаты проточного цитометрического анализа человеческих моноцитов, инкубированных с гомеопатическими препаратами

Модельная система		Количество флуоресцирующих клеток, %	Средняя интенсивность флуоресценции, отн. ед.
клетки	препарат		
Класс I МНС	Контроль	99,7	83,5
	<i>Phytolacca</i>	99,9	71,7
	Контроль	99,7	119,6
	Гистамин	99,9	126,6
Класс II МНС	Контроль	69,5	52,6
	<i>Phytolacca</i>	77,3	55,3
	Контроль	71,9	53,5
	Гистамин	86,4	62,5
CD14 ⁺ , ЛПС-стимулятор	Контроль	83,0	311
	<i>Phytolacca</i>	82,0	281,5
	Контроль	81,7	259,8
	Гистамин	82,5	273,2
Обработанные γ-интерфероном	Контроль	81,9	290,4
	<i>Phytolacca</i>	83,9	320,9
	Контроль	82,9	285,8
	Гистамин	83,4	286,8

регуляцию синтеза цитокинов и секрецию сублиний человеческих лейкоцитов под действием гомеопатических препаратов. Кроме того, будущие исследования должны оценить степень надежности принципов, выявленных на основании экспериментов *in vitro*, в предклинических испытаниях (на мышах).

Заключение

Представленная работа является фундаментальным шагом в исследованиях физиологических и молекулярных эффектов, вызванных одним или несколькими химическими агентами в ультранизких концентрациях. Полученные результаты указывают на существование новых для нас явлений, они развивают новые концепции и принципы формирования биологического эффекта веществ при чрезвычайно высоких разбавлениях.

Примеры, близкие к нашим результатам, опубликованы в работах [16, 17]. Авторы этих исследований ясно показали, как рецепторы антигенов переводят количественные различия рецептор-лигандного связывания в качественно различные биологические ответы. По аналогии можно полагать, что лиганды в ультранизких концентрациях могут взаимодействовать с рецепторами совершенно иным образом, чем в высоких концентрациях, что соответствует нашим предварительным данным. Несмотря на то, что мы все еще далеки от количественного понимания процессов, происходящих при активации, индуцируемой этими рецепторами, на следующем этапе исследований важно получить четкие представления, каким образом молекулярные компоненты взаимодействуют в интактной клетке в более компартиментализованных условиях.

Предварительные результаты, полученные при изучении иммуномодуляции двумя гомеопатическими препаратами, весьма обнадеживающие, они впервые продемонстрировали эффекты, которые могут быть отнесены к клиническим ответам, реализуемым *in vivo*. Однако было бы слишком преждевременно переносить предполагаемые механизмы и природу эффектов, выявленные в наших наблюдениях *in vitro*, на системы *in vivo*. Тем не менее, предварительные результаты дают все основания считать, что развиваемое направление перспективно и в последующих работах должен быть расширен круг препаратов, тестируемых на иммуномодулирующую активность.

Мы призываем специалистов обратиться к этой области исследований и найти новые источники финансирования для продолжения начатых работ.

* * *

Работа проведена при финансовой поддержке Boiron Research Foundation.

В работе принимали участие сотрудники лаборатории Б. Бонавиды: доктора Иочи Мутазани, Хидеки Моримото, Джефрей Сафрит, Патрик Фрост, Гермес Гарбан. Значительную помощь в подготовке рукописи к печати оказала Саманта Нгуен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Linde K., Clausius N., Ramirez G.E. e.a. *Lancet*, 1997, v. 350, p. 834–843.
2. Tsuchitani T., Zigelboim J., Berek J., Bonavida B. *J. Cell. Pharmacol.*, 1991, v. 2, p. 32–40.
3. Bonavida B., Safrit J., Tsuchitani T., Zigelboim J. In: *Ultra Low Doses*. Ed.: C. Dautrempuich. Washington: Taylor & Francis D.C., 1991, p. 27–43.
4. Safrit J.T., Tsuchitani T., Berek J. e.a. In: *New frontiers in the therapy of malignancies: From biological approaches to clinical studies*. Serono Symposium Rev. № 25. Eds. G. Mantovani, B. Bonavida e.a. Published by Ares Serono Symposia via Ravencia 8, Rome, Italy, 1991, p. 11–17.
5. Safrit J.T., Bonavida B. *Cancer Res.*, 1992, v. 52, p. 6630–6637.
6. Safrit J.T., Berek J.S., Bonavida B. *Gynecol. Oncol.*, 1992, v. 48, p. 214–220.
7. Safrit J.T., Beldegrun A., Bonavida B. *J. Urology*, 1993, v. 149, p. 1202–1208.
8. Chang M.P., Bramhall J., Graves S. e.a. *J. Biol. Chemistry*, 1989, v. 264, p. 15261–15267.
9. Morimoto H., Safrit J.T., Bonavida B. *J. Immunol.*, 1991, v. 147, p. 2609–2616.
10. Morimoto H., Bonavida B. *Ibid.*, 1992, v. 149, p. 2089–2094.
11. Morimoto H., Bonavida B. *Cell. Pharmacol.*, 1995, v. 2, p. 147–152.
12. Morimoto H., Yonehara S., Bonavida B. *Cancer Res.*, 1993, v. 53, p. 2591–2596.
13. Uslu R., Bonavida B. *Cancer*, 1996, v. 77, p. 725–732.
14. Mori S., Murakami-Mori K., Jewett A. e.a. *Cancer Res.*, 1996, v. 56, p. 1874–1879.
15. Frost P., Ng C.P., Beldegrun A., Bonavida B. *Cell. Immunol.*, 1997, v. 180, p. 70–83.
16. Torigoe C., Inman J.K., Metzger H. *Science*, 1998, v. 281, p. 568–572.
17. Kersh E.N., Shaw A.S., Allen P.M. *Ibid.*, 1998, v. 281(5376), p. 572–575.