

Eksperymentalne Badania Wpływu Eliksiru China No. 1 Tian Xian na Nieswoistą Odporność Myszy

Przedmiot • Podstawa • Materiały i Metody • Wyniki i Omówienia • Bibliografia

Robert W. Bradford D. Sc. 1

Kexiang Ding 2

1. Bradford Research Institute, CA, USA

Professor of Capital University, Washington DC

2. FRC Free Radical Biology & Medical Research Center

PRZEDMIOT

Opracowanie to opisuje badania wpływu FRC001 na nieswoistą odporność myszy i odrzutu przeszczepu (graft versus host reaction - GVHR). Otrzymane wyniki wskazują, że FRC001 posiada pewien wpływ na wzmożenie funkcji fagocytarnej monojądrowych makrofagów, wskaźnik śledziony i grasicy, przemianę śledzionowych limfocytów, formacji surowicy hemolitycznej, współczynnika reakcji zwrotnej śledziony oraz współczynnika stymulacji i wskaźnika bodźca, np. FRC001 może zwiększyć i usprawnić humoralną i komórkową odporność, stanowiąc podstawę eksperymentalnego stosowania go w regulacji odporności oraz zapobieganiu rozwojowi i leczeniu guzów nowotworowych.

Słowa Kluczowe : FRC001, Nieswoista odporność, Reakcja odrzutu przeszczepu (GVHR)

powrót [w GÓRE](#) .

PODSTAWA

Tworzenie się guzów nowotworowych związane jest z niedostateczną odpornością organizmu. Istnieje wiele raportów traktujących o wskaźniku niedostatecznej odporności, który uważany jest jako bardzo istotny w badaniach antyneoplastycznych. Poniższe eksperymenty badały wpływ FRC001 na nieswoistą odporność myszy oraz reakcję odrzutu (GVHR).

powrót [w GÓRE](#) .

MATERIAŁY I METODY

1. Materiały
2. 1.1 Przedmiot : FRC001.
1.2 Zwierzę eksperymentalne : mysz czystej rasy Kunming, 18~22g, osobniki obu płci dostarczone przez Experimental Animal Center of Jiangsu Tumor Prophtlactico-therapeutic Research Institute.
3. Metody

2.1 Fagocytarne funkcje monojądrowych makrofagów (test usuwania węgla z organizmu myszy)

2.1.1 Założenia eksperymentalne :

Myszy eksperymentalnej wstrzyknięto atrament indyjski, użyty w doświadczeniu jako obce ciało krystaliczne. Atrament indyjski uległ fagocytozie i został usunięty przez monojądrowe makrofagi po wejściu w cyrkulację. 90 procent jego ilości zostało sfagocytozowane przez komórki Kupffera wątroby a reszta przez makrofagi śledziony. Wskaźnik oczyszczenia obiegu z obcego ciała krystalicznego odzwierciedla fagocytarne funkcje monojądrowych makrofagów. W danym przypadku, wskaźnik oczyszczenia z obcego ciała krystalicznego miał ścisły związek z podaną dawką ciała obcego, np. wskaźnik fagocytozy był wprost proporcjonalny do koncentracji w obiegu jego dawki. Istniała liniowa zależność w systemie pomiędzy współrzędną czasu zobrazowaną na osi odciętych i wartością koncentracji krystalicznego ciała obcego stanowiącą oś rzędnych. Nachylenie K linii zależności, stanowi wskaźnik fagocytozy (lub inaczej wskaźnik oczyszczenia).

2.1.2 Przebieg doświadczenia.

Myszy użyte w doświadczeniu losowo podzielono na : negatywną grupę kontrolną, pozytywną grupę kontrolną oraz grupy zróżnicowanego dawkowania FRC001. Myszy karmiono mlekiem elementarnym i wodą destylowaną oraz różnymi dawkami FRC001 przez kolejne 10 dni. Każdej myszy wstrzykiwano tusz indyjski (rozcieńczony 1~5 razy) 0.05ml/10g.wagi ciała do żyły ogonowej 30 minut po ostatnim karmieniu. W pierwszej minucie (t1) i piątej minucie (t5) po wstrzyknięciu 20 m1, usunięto krew przy pomocy tuby ssącej przesmarowanej roztworem heparyny a następnie rozcieńczono w 2ml 0.1% roztworu węglańu sodu. Absorpcja (A) roztworu krwi testowana była przy 680nm. Obliczono następnie współczynnik K z następującego wzoru : $(\lg A1 - \lg A5) / (t5 - t1) = (\lg A1 / A5) / 4$

2.2 Test na reakcję odrzutu GVHR. Dwie liniowo czyste myszy C57BL JCR skrzyżowano w celu uzyskania nowego potomstwa. Zaczynając od pierwszego dnia urodzin nowych myszy, karmiono eksperymentalne samce (rodziców) FRC001 przez 10 dni, podczas gdy samcom w grupie kontrolnej nie podawano żadnych leków. Na 11 dzień po urodzeniu małych myszy, samce (rodzice) były uśmiercane i separowano ich śledzionę. Następnie przy pomocy aseptycznej techniki, przygotowano zawiesinę komórek śledziony (1×10^8 /ml). Nowo narodzone myszy podzielono na grupę eksperymentalną, grupę kontrolną i grupę normalną. Nowo narodzone myszy z grupy eksperymentalnej zostały zaszczepione 0,1 ml zawiesiny komórek śledziony eksperymentalnego samca (rodzica), w jednakowy sposób postąpiono w przypadku nowych myszy i samca (rodzica) z grupy kontrolnej. Nowo narodzonym myszom z normalnej grupy nie podawano żadnego środka. Wszystkie nowo narodzone myszy uśmiercono w siódmym dniu po ich zaszczepieniu, a następnie zważono dokładnie ich śledziony i wyliczono wskaźnik śledziony (mg śledziony/10g.wagi ciała). Potem wyliczono współczynnik bodźca śledziony (SI) ze wzoru:

$SI = (\text{Średni wskaźnik śledziony w gr. eksperymentalnej lub kontrolnej}) / \text{Średni wskaźnik śledziony w gr. normalnej.}$

2.3 Test Wskaźnika śledziony i wskaźnika grasicy.

Myszy gatunku Kunming (18~22g) zostały losowo podzielone na negatywną grupę kontrolną (karmione N>S). pozytywną grupę kontrolną i grupę FRC001. Karmiono je właściwie dla określonej grupy przez kolejnych 10 dni i uśmiercano przez wywołanie krwotoku oczodołu w drugi dzień po ostatnim karmieniu. Następnie wyseparowano

ich śledziona oraz grasica i dokładnie je zważono. Otrzymane rezultaty pokazują wskaźniki wagowe śledziona i grasicy (mg)/10g.wagi ciała.

2.4 Test przemiany limfocytów u myszy -kolorymetria myszej śledziona MTT.

Mysz czystego gatunku Kunming uśmiercono wywołując krwotok z oczodołu i wyjęto jej śledzionę w celu sporządzenia 5×10^8 /ml zawiesiny komórek z roztworem Hanks'a oraz średnią zawiesinę komórek RPM 1640. Po 100 m1 zostało dodanych do otworów w naczyniu posiewowym, do każdego z otworów naczynia dodano też PHA 100 m1 oraz leki eksperymentalne, podczas, gdy otwór kontrolny pozostawał zakryty. Szczepy te hodowano w temp. $37 \sim 38^\circ \text{C}$.5% w inkubatorze z CO₂ przez 72 godziny. Do każdego otworu dodano 50 m1 MTT 4~5 godzin przed zakończeniem hodowli. Później kontynuowano jeszcze hodowlę przez odpowiednio kolejne 24h, 36h i 48h. Potem, włożono je do lodówki w temp. 4 C na jedną noc. Następnie odessano powierzchniowy osad i 150 jego m1 dodano 150 m1 kwasu izopropanolowego a następnie wdmuchnięto do homogenicznego roztworu. Absorpcja (A) każdego cylindra była testowana przy 630 nm wskazania fotometru ELISA. Szczegóły tych badań dostępne są w poz. [10] załączonej bibliografii.

2.5 Test hemolizyny w surowicy.

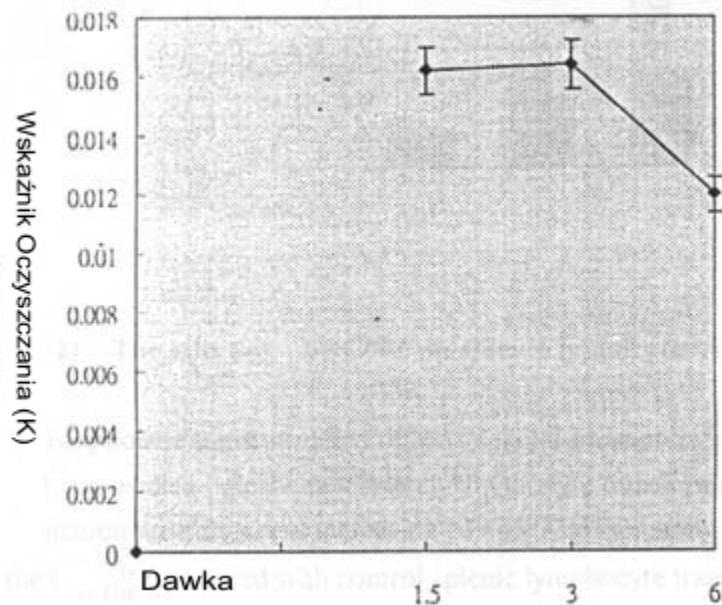
1.Myszy (rasa Kunming, 18~22g) zostały losowo podzielone na grupy : grupę nieimmunologiczną, grupę immunologiczną oraz grupę immunologiczną leczoną (z 3 różnymi rodzajami dawek; małą średnią i wysoką). Każdej myszy z dwóch ostatnich grup wstrzyknięto 0.2 ml czerwonych krwinek owcy (SRBC), które rozpuszczono do 3:5(V/V) z N.S Myszom w grupie leczonej podawano lek przed i po zaszczepieniu. Cztery dni po zaszczepieniu pobrano 1 ml krwi do sporządzenia surowicy. Dla otrzymania większej ilości szczegółów prosimy zapoznać się z bibliografią poz .[8].

powrót [w GÓRE](#) .

WYNIKI I OMÓWIENIA

1. Wpływ FRC001 na fagocytarne funkcje monojądrowych makrofagów u myszy (Wykres 1.)

1.



Wykres 1. Krzywa wpływu FRC001 na fagocytarne funkcje monojądrowych makrofagów u myszy

Zwiększenie wskaźnika oczyszczania (K) wprost odzwierciedla wzrost fagocytarnych funkcji monojądrowych makrofagów i nieswoistej odporności. Zgodnie z Wykresem 1., niskie, średnie i wysokie dawki FRC001 znacznie zwiększały wartość K, ($p < 0.01$). Wynik wskazuje, że FRC001 może wzmocnić fagocytarne funkcje monojądrowych makrofagów i nieswoistą odporność.

2. Wpływ FRC001 na wskaźnik śledziony i grasicy. (Tabela 1.)

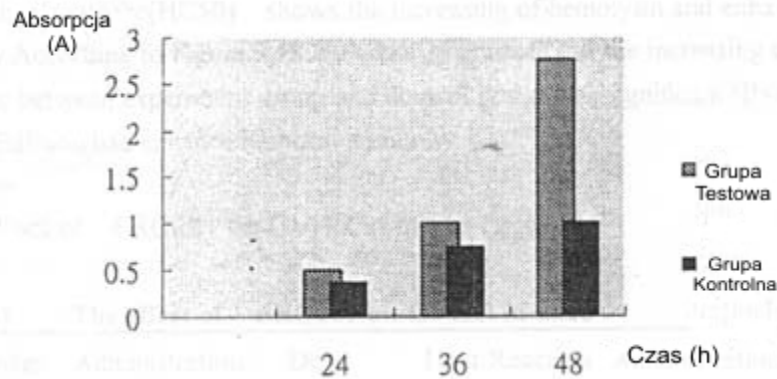
Grupa	Ilość (n)	Dawka	X aSD(mg/10g.bw)	
			SI	TI
Kontrolna	10	0	69.59 a25.59	26.23 a9.01
FRC001	10	6.0 X 10(mg/kg X d)	64.92 a35.91*	27.03 a13.03*
Mleko Elementarne	10	100 X 10(mg/kg Xd)	78.26 a22.82*	16.15 a2.60 ***

w porównaniu do gr. kontrolnej * $P > 0.05$; *** $P < 0.01$

Tabela 1. Wpływ FRC001 na wskaźnik śledziony (SI) i wskaźnik grasicy (TI)

Śledziona i grasica są bardzo ważnymi organami immunologicznymi. Ich degeneracja i atrofia, mają duży wpływ na ich normalne funkcjonowanie. Zgodnie z Tabelą 1., FRC001 miał nieznaczący wpływ na SI oraz TI ($P > 0.05$). Otrzymane rezultaty wskazują, że Edfrann nie wykazywał żadnego dowiedzionego wpływu na organy immunologiczne. Autorzy domniemają, że było to być może spowodowane krótkim czasem eksperymentu.

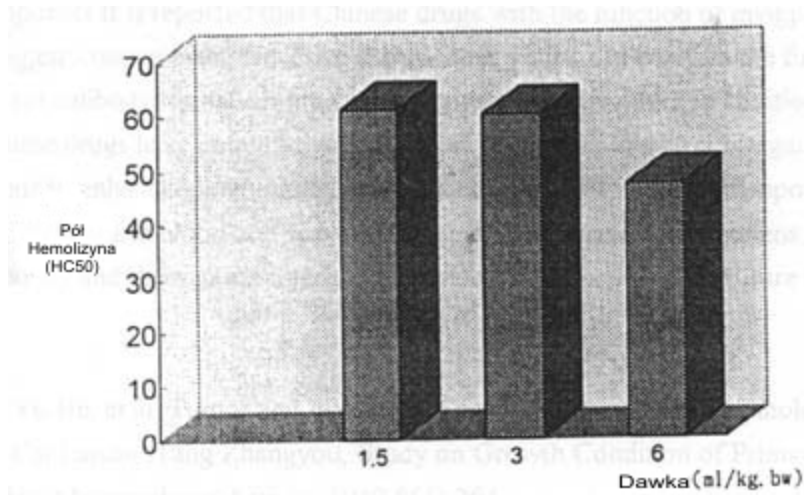
3. Wpływ FRC001 na przemianę śledzionowych limfocytów u myszy. (Wykres 2.)



Wykres 2. Wpływ FRC001 na przemianę śledzionowych limfocytów u myszy.

Przemiana śledzionowych limfocytów odzwierciedla poziom immunologicznych funkcji komórek. Według Wykresu 2., FRC001 miał ewidentny wpływ na przemianę śledzionowych limfocytów. Rosła ona w miarę upływu czasu. Amplituda wzrostu miała najwyższą wartość pomiędzy 26 a 48 godziną eksperymentu. W porównaniu do grupy kontrolnej, przemiana śledzionowych limfocytów w 24h, 36h, i 48h wzrosła w znaczący sposób ($P < 0.01$). Wyniki wskazują, że FRC001 potrafi wzmacniać funkcje odpornościowe komórek organizmu.

4. Wpływ FRC001 na surowicę hemolityczną (Wykres 3.)



Wykres 3. Krzywa wpływu FRC001 na formację surowicy hemolitycznej.

Hemolizyna (IgM) odzwierciedla poziom odporności humoralnej. W trakcie eksperymentu wystąpiło zwiększenie absorpcji półhemolizyny (HC50), wskazujące na wzrost hemolizyny i tym samym odporności humoralnej. Zgodnie z wykresem 3., HC50 wzrastało stopniowo, w miarę zwiększania dawki FRC001. Różnica pomiędzy grupą eksperymentalną, a kontrolną była bardzo znacząca ($P < 0.01$). Otrzymane rezultaty wskazują, że Edfrann ma wpływ na wzrost odporności humoralnej.

5. Wpływ FRC001 na GVHR u myszy (Tabela 2.).

Grupa	Ilość	Sposób Podania	Dawka (mg/kg Xd)	Wskaźnik Reakcji Odrzutu (mg spleen/g.w)	Wskaźnik Bodźca (SI)
Normalna	8	ig	0	7.76 a1.14 ***	-
Kontrolna	8	ig	6.0 X 10	9.82 a1.36 **	1.22
FRC001	8	ig	6.0 X 10	12.96 a1.88	1.96

W porównaniu z grupą FRC001, *P>0.05; **P<0.05; ***P<0.01

Tabela 2. Wpływ FRC001 na (reakcję odrzutu przeszczepu) GVHR u myszy.

GVHR odzwierciedla funkcję odporności komórkowej na wskaźnik odrzutu przeszczepu oraz wskaźnik bodźca. Zgodnie z Tabelą 2, wskaźnik odrzutu przeszczepu oraz wskaźnik bodźca były w grupie FRC001 znacznie większe niż w grupie normalnej (bez aplikacji jakichkolwiek środków) oraz grupie kontrolnej (w której podawano tylko wodę destylowaną) (P<0.05 lub P<0.01). Rezultaty pokazują, że Edfrann może zwiększać i poprawiać funkcje odporności komórkowej.

Wszystkie z powyższych wyników zgodnie wskazują, że FRC001 miał pewien wpływ na nieswoistą odporność eksperymentalnych myszy. Regulacyjne działanie FRC001 na odporność jest prawdopodobnie związane z jego składnikami. Udowodniono bowiem, że chińskie leki oddziałujące na ożywienie Qi, krew, ocieplenie Yang, ..itd. zawierają wiele bioaktywnych składników, które usprawniają funkcjonowanie systemu siateczkowo-śródbłonkowego, formacji antyciał oraz swoistej i nieswoistej odporności. Dodatkowo, w przypadku chińskich leków ich wpływ na niszczenie wolnych rodników wspiera funkcje ochronne organów immunologicznych, reguluje odporność, usprawnia czynniki odpornościowe, ..itd.. FRC001 zawiera składniki ożywiające Qi, oraz krew, a także ocieplające krew oraz niszczące wolne rodniki. Inne jego składniki odgrywają dużą rolę w regulacji odporności organizmu i stymulacji jej nasilenia. Lepsze poznanie ich biologicznego oddziaływania będzie przedmiotem badań w najbliższej przyszłości.

powrót [w GÓRE](#).

BIBLIOGRAFIA

1. Yu He, et al. *Tumor and immunity*, Shanghai Science and Technology Press, 1982, 114.
2. Cai Limian, tang Zhagyong, *Study on Growth Condition of Primary Carcinoma of Liver and Host Macrophage Activity*, 1989, 8(4):264.
3. Yang Guizheng, Xu Yiping, *Lymphocyte Function Test, Clinical Immunologic Technology*, Shanghai Science and Technology Press, 1982:314.
4. Wang Yixun, et al. *The Study on Antitumor Science and Technology Press, Beijing*, 1996, 337~378.
5. Zhou Junfang, et al. *The Effect of Stress on Tumor Metastasis and the Immunologic Mechanism*, *Cancer* 1992, 11(2):107~110.
6. Cheng Qin, *Antiaging Research Experimental Methods, Chinese Medical Science and Technology Press, Beijing*, 1996, 337~378.
7. Tao Yixun, et al. *Clinical Immunologic Test, Shanghai Science and Technology Press*, 1983:105.

8. *Xy Xueying, et al. An Improved Humoral immunity Test-Hemolysin Essay, Pharmaceutical Acta 1979, 14(7):443.*
9. *Xu Shikai, et al. Antiaging Material Meics, 1 st edition Chinese Medical Science and Technology Press, Beijing, 1995, 164~165.*
10. *Li Denghua, Tian Zhigan, Zhang Jie, et al, Rapid Determination of Cytotoxicity of Drugs on Suspended Tumor Cell, 1991, 10(3):226~228.*
11. *Ader R. Psyvhoneuro immunology. New York, Academic Press Inc, 1981:37.*
12. *Tsutomu Okimura, et al. Effect of Restraintatress on Delay typer-sens-activity and Phagocytosis in Mice, Jean, J. Pharmacol, 1986, 41:229.*
13. *Brown Re, et al. Fatty Aids and Inhibition of Mitogen-Induced Lymphocyte Transformation by leukemic gerum. J Immunol, 1983, 131:101.*