ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОКОРРИГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СУММАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ *COLURIA GEOIDES* (PALL.) LEDEB. (*ROSACEAE*)

С. В. Дутова[1], М. Р. Карпова[2], М. А. Мяделец[3], Н. В. Масная[4], Е. Ю. Шерстобоев[4]

Проведено доклиническое исследование иммунокорригирующего действия суммарных препаратов из сырья эфиромасличного растения *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) при экспериментальном иммунодефиците. Исследуемые препараты устраняли проявления иммунодефицита, развивающиеся при применении циклофосфана: угнетение синтеза антиэритроцитарных антител-агглютининов и пролиферативных процессов в селезенке. Под влиянием препаратов *C. geoides* абсолютное число кариоцитов и количество антителообразующих клеток селезенки достоверно превышали перечисленные показатели в группе животных с экспериментальным иммунодефицитом, достигая в отдельных случаях фоновых значений. Изучаемые препараты оказывали более выраженное стимулирующее действие на синтез специфических иммуноглобулинов и пролиферацию антителообразующих клеток селезенки, чем настойка эхинацеи. Препарат С-2 (экстракт из подземных органов и травы *C. geoides*, полученный методом перколяции 70 % этанолом) наиболее перспективен для углубленного исследования с целью разработки нового эффективного иммунокорректора.

Ключевые слова: *Coluria geoides*; иммунокорригирующее действие; иммунодефицит; антителообразующие клетки селезенки; антиэритроцитарные антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что нарушения в иммунной системе играют важную роль в хронизации заболеваний и развитии осложнений [8]. Иммунодефициты, как правило, сопровождают большинство бактериальных и вирусных инфекций, что приводит к необходимости включения в схему фармакотерапии иммунотропных препаратов [2, 5]. Необходимый эффект можно получить при применении растительных препаратов, содержащих комплекс мягко воздействующих на иммунную систему биологически активных веществ. Известны иммуностимулирующие свойства растительных фенилпропаноидов различных классов [9]. В качестве источников фенилпропаноидов большой интерес представляет эфиромасличное растение *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*), в эфирном масле которого содержится 90 – 98 % простого фенилпропаноида эвгенола [1, 4]. Кроме того, в подземных органах и надземной части растения обнаружены фенольные соединения: агликоны и гликозиды кверцетина и кемпферола, кумарины и фенолкарбоновые кислоты [6]. Целью настоящего исследования явилось изучение иммунокорригирующих свойств суммарных препаратов из сырья *C. geoides* на модели экспериментальной иммунодепрессии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые суммарные препараты (препараты С-1 и С-2) получали из сырья (корневищ с корнями и надземной части) *C. geoides* методом перколяции с помощью этанола различной концентрации (С-1 – 40 % этанолом, С-2 – 70 % этанолом). Препараты стандартизовали по выходу экстрактивных веществ: С-1 — (2,83 ± 0,052) %, С-2 — (1,60 ± 0,034) % от объема жидкого экстракта, а также по содержанию *m*-кумаровой кислоты, которое определяли методом ВЭЖХ на приборе “Agilent 1200” с диодноматричным детектором и системой ChemStation. Содержание *m*-кумаровой кислоты в препарате С-1 составило 8,68 %, в препарате С-2 — 5,68 % от массы сухого экстракта. В качестве препарата сравнения использовали официальную настойку эхинацеи (НЭ) пурпурной (ООО “Ватхэм – Фармация”, Рязань).

Исследование выполнено на 182 мышах-самках линии CBA/CaLac массой 18 – 20 г в возрасте 2 – 2,5 мес, полученных из отдела экспериментального биомедицинского моделирования ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга” СО РАМН (Томск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией (Страсбург,

[1] ФГБОУ ВПО Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова, 655017, Абакан, ул. Ленина, 90.
[2] ФГБОУ ВПО “Сибирский государственный медицинский университет”, Томск.
[3] Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск.
[4] ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга” СО РАМН, Томск.

© 2015 Коллектив авторов

1986), из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Животные были разделены на 5 групп ($n = 34 – 38$): 2 контрольные и 3 экспериментальные. Животным 1-й контрольной группы однократно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Экспериментальную модель иммунодепрессии у животных 2-й контрольной и 3 экспериментальных групп создавали однократным введением циклофосфана (ЦФ) (ОАО "Биохимик", Саранск), внутрибрюшинно в максимально переносимой дозе (250 мг/кг). Животные экспериментальных групп, начиная со дня введения ЦФ, в течение 5 сут (1 раз в день) получали исследуемые препараты (сухие экстракты, стандартизованные по экстрактивным веществам и содержанию *m*-кумаровой кислоты) и препарат сравнения — высушенную до постоянной массы НЭ в виде растворов в дистиллированной воде внутрижелудочно в дозе 50 мг/кг сухого экстракта, животным контрольных групп вводили дистиллированную воду.

Иммунокорригирующее действие препаратов *C. geoides* в условиях экспериментальной иммунодепрессии оценивали по их способности влиять на синтез антител-гемагглютининов и лимфопролиферативные процессы. Для этого на 5 день после введения ЦФ животных всех групп иммунизировали корпускулярным тимусзависимым антигеном — эритроцитами барана (ЭБ) в объеме 0,2 мл 15 % суспензии. Забор материала для исследования осуществляли на 4, 7, 14 и 21 день после иммунизации (на 8, 11, 18, 25 день после введения ЦФ). Общее число кариоцитов селезенки определяли стандартными гематологическими методами, титр антител-гемагглютининов — в реакции пассивной гемагглютинации (титр антиэритроцитарных IgG после обработки сыворотки крови 0,1 М раствором 2-меркаптоэтанола), число антителообразующих клеток (АОК) селезенки — методом локального гемолиза [3, 7, 11].

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statiatics 19, представляли в виде медианы с 25 и 75 % квартилями. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, различия между выборками считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента установлено, что однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 250 мг/кг приводит к угнетению у животных лимфопролиферативных процессов в селезенке и подавлению синтеза антиэритроцитарных антител. Все исследуемые показатели у животных 2-й контрольной группы были статистически достоверно ниже аналогичных показателей мышей 1-й контрольной группы, получивших физиологический раствор (табл. 1, 2; рис. 1, 2).

Число кариоцитов селезенки у животных 2-й контрольной группы достоверно уменьшилось, по сравнению с показателями животных 1-й контрольной группы (в среднем от 106,00 до 153,75 млн клеток/орган) и в течение эксперимента колебалось в среднем от 29,50 (на 4 сут после введения антигена) до 66,87 млн клеток/орган (на 14 день) (табл. 1). Курсовое применение препаратов *C. geoides* устраняло иммунодепрессивное действие ЦФ, достоверно, по сравнению с показателями животных 2-й контрольной группы (модель иммунодефицита), в 1,6 – 5,8 раза в динамике (с 4 по 21 день после введения ЭБ) увеличивая число кариоцитов селезенки (табл. 1). На 7 день этот показатель оказался выше уровня показателей животных 1-й контрольной группы (без иммунодефицита) (табл. 1). Наиболее выраженный эффект на 4 и 7 день исследования, достоверно превосходящий действие препарата сравнения (НЭ), проявил препарат С-2 (табл. 1).

Введение иммунодепрессанта привело к достоверному угнетению синтеза антител-гемагглютининов, которые были обнаружены в сыворотке крови животных с экспериментальным иммунодефицитом (2-й контрольной группы) только на 14 день в незначительном титре [$lg_2T = 0,00$ (0,00 – 1,16)] (рис. 1). У животных 1-й контрольной группы пик синтеза антител приходился на 7 сут после введения антигена [$lg_2T = 6,32$

Таблица 1. **Влияние на иммунопролиферативные процессы в селезенке, медиана (25 – 75 % квартили)**

Группа животных	*n*	Число кариоцитов селезенки, млн клеток/орган			
		4 день	7 день	14 день	21 день
1-я контрольная (физиологический раствор)	36	126,25 (118,94 – 170,50)	106,00 (93,75 – 117,45)	153,75 (138,75 – 155,50)	129,25 (86,75 – 138,75)
2-я контрольная (ЦФ)	38	29,50 (21,44 – 48,06)	46,50 (34,25 – 50,25)	66,87 (56,75 – 73,31)	52,88 (38,25 – 70,00)
1-я экспериментальная (С-1 + ЦФ)	38	69,75 (33,25 – 90,25)*#	151,88 (109,00 – 197,88)*#	105,75 (96,38 – 107,50)*#	104,25 (74,88 – 114,63)#
2-я экспериментальная (С-2 + ЦФ)	34	75,25 (64,52 – 83,50)*#&	270,00 (233,25 – 312,12)*#&	89,25 (85,50 – 115,50)*#	88,88 (55,25 – 112,69)#
3-я экспериментальная (НЭ + ЦФ)	36	63,50 (56,13 – 83,50)*#	198,50 (185,75 – 244,69)*#	116,25 (103,50 – 166,25)#	87,50 (71,37 – 114,19)#

Различие достоверно между показателями: * — экспериментальных и 1-й контрольной группы (без иммунодефицита), # — экспериментальных и 2-й контрольной группы (с экспериментальным иммунодефицитом), & — групп животных, получавших исследуемые препараты и препарат сравнения.

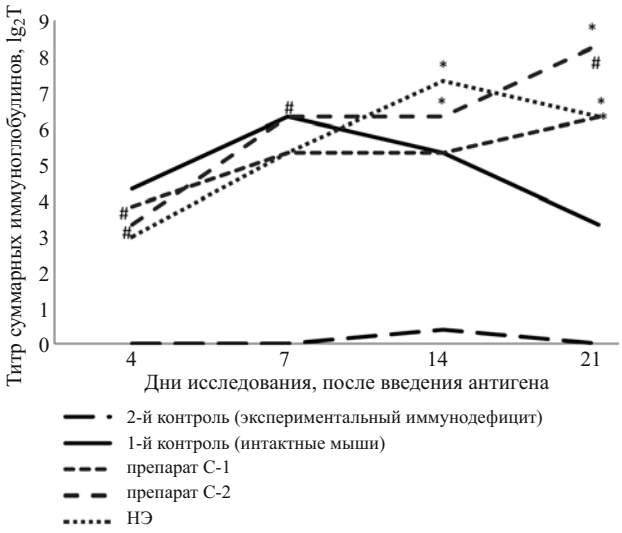

Рис. 1. Влияние препаратов *C. geoides* и настойки эхинацеи на титр суммарных иммуноглобулинов к эритроцитам барана в плазме крови мышей с экспериментальным иммунодефицитом.

* $p \le 0,05$ — степень достоверности различия относительно контроля 1, # — $p \le 0,05$ — степень достоверности различия относительно препарата сравнения (настойки эхинацеи).

(5,32 – 7,32)], к 21 дню титр снижался до 3,32 (2,57 – 4,07) (рис. 1). Исследуемые препараты устраняли действие ЦФ, достоверно в 3,8 – 8,3 раза увеличивая титр антител-гемагглютининов, по сравнению с аналогичным показателем животных 2-й контрольной группы (рис. 1).

После введения препарата С-1 в период с 4 по 14 день исследования наблюдалось незначительное увеличение титра антител, на 21 день этот показатель превышал значение показателя животных 1-й контрольной группы (рис. 1). Под влиянием препарата С-2 титр антиэритроцитарных антител достигал значения животных без иммунодефицита уже к 7 дню, до 14 дня сохранялся на таком же уровне, к 21 сут увеличивался до 8,32 (5,32 – 9,32), превышая показатель животных 1-й контрольной группы в 2,5 раза ($p = 0,000$). После введения препарата сравнения (НЭ) наблюдалось достоверное увеличение синтеза антиэритроцитарных антител в 2,3 – 7,3 раза, пик синтеза приходился на 14 день после введения антигена, с постепенным снижением титра к 21 дню (рис. 1).

Препараты С-1 и С-2 оказывали иммунокорригирующее влияние на синтез специфических антител, статистически сопоставимое с действием препарата сравнения, и более длительно поддерживали их титр на высоком уровне, по сравнению с НЭ. Препарат С-2 в более ранние сроки, чем препарат сравнения (на 7 день эксперимента), способствовал повышению их синтеза до уровня, соответствующего показателю животных без иммунодефицита.

Большой интерес представляло изучение влияние исследуемых препаратов на синтез специфических IgG к ЭБ, так как они являются более специфичными к антигену и обеспечивают большую напряженность гуморального иммунного ответа [10].

В сыворотке крови иммуносупрессированных животных 2-й контрольной группы в течение 21 дня после введения антигена (ЭБ) специфические IgG не были обнаружены (рис. 2). У животных 1-й контрольной группы (без иммунодепрессии) специфические IgG определялись в сыворотке крови в максимальной концентрации с 7 по 14 день после введения антигена, к 21 дню их титр незначительно снижался (рис. 2).

Исследуемые препараты устраняли действие иммунодепрессанта: препарат С-1 достоверно на 14 – 21 день, препарат С-2 достоверно в течение всего периода исследования увеличивали титр IgG до значений у животных без иммунодепрессии и выше ($p = 0,002$, $p = 0,000$, рис. 2). Кроме того, под влиянием препаратов *C. geoides* концентрация IgG продолжала увеличиваться до 21 дня. Препарат сравнения (НЭ) также стимулировал синтез специфических IgG к ЭБ: пик их синтеза приходился на 14 день после введения антигена и был выше аналогичного показателя животных без иммунодепрессии, к 21 дню их концентрация снижалась (рис. 2). Исследуемые препараты корригировали синтез специфических IgG к ЭБ сопоставимо с действием препарата сравнения, но способствовали поддер-

Таблица 2. **Влияние на пролиферацию АОК селезенки, медиана (25 – 75 % квартили)**

Группа животных	*n*	Относительное число АОК селезенки, %			
		4 день	7 день	14 день	21 день
1-я контрольная (физиологический раствор)	36	25,0 (22,7 – 27,9)	29,0 (27,5 – 32,3)	31,2 (28,6 – 32,5)	18,2 (15,5 – 20,8)
2-я контрольная (ЦФ)	38	8,2 (6,2 – 10,0)	19,0 (17,6 – 20,7)	25,8 (24,1 – 26,2)	10,8 (10,2 – 11,5)
1-я экспериментальная (С-1 + ЦФ)	38	16,0 (14,3 – 18,2)*#&	23,8 (22,6 – 26,5)#&	35,6 (33,8 – 38,2)*#&	15,6 (15,3 – 16,8)#
2-я экспериментальная (С-2 + ЦФ)	34	16,8 (14,0 – 18,3)*#&	26,0 (24,8 – 26,6)#&	28,8 (27,6 – 30,8)#&	24,0 (22,8 – 24,6)*#&
3-я экспериментальная (НЭ + ЦФ)	36	9,6 (8,0 – 10,9)*	12,0 (11,5 – 12,8)*#	16,2 (14,8 – 16,6)*#	20,6 (18,2 – 20,2)#

Различие достоверно между показателями: * – экспериментальных и 1-й контрольной группы (без иммунодефицита), # – экспериментальных и 2-й контрольной группы (с экспериментальным иммунодефицитом), & – групп животных, получавших исследуемые препараты и препарат сравнения.

жанию их концентрации в сыворотке крови более продолжительное время и достоверно ($p \le 0{,}001$) на более высоком уровне на 21 день после введения антигена.

Применение ЦФ приводило к достоверному, в 3 (на 7 день после введения ЭБ) и 1,2 (на 14 день) раза угнетению пролиферации клеток селезенки, продуцирующих специфические антитела к ЭБ (табл. 2).

Максимум накопления АОК селезенки у животных 2-й контрольной группы (получавших ЦФ) регистрировали на 14 день после введения ЭБ (25,8 %) с последующим снижением их числа на 21 день (10,8 %). Препарат сравнения (НЭ) приводил к снижению числа АОК селезенки, по сравнению с показателями животных 2-й контрольной группы достоверно ($p = 0{,}004$, $p = 0{,}008$, соответственно) на 7 и 14 день после введения ЭБ (табл. 2). Только на 21 день под его влиянием число АОК достоверно увеличивалось выше показателя животных без иммунодепрессии. Под влиянием исследуемых препаратов относительное число АОК селезенки в период с 4 по 14 день достоверно в 1,3 – 2,2 раза увеличивалось, по сравнению с показателями животных 2-й контрольной группы (табл. 2), к 21 дню – снижалось. Максимальное содержание АОК в группах экспериментальных животных регистрировали на 14 день после введения антигена, причем значение этого показателя у животных, получавших препарат С-1, достоверно ($p = 0{,}017$) превысило показатель животных без иммунодепрессии (табл. 2). Следовательно, при курсовом введении препараты *C. geoides* оказывают статистически достоверное более выраженное иммунокорригирующее действие, направленное на процесс пролиферации специализированных АОК селезенки, чем препарат сравнения (НЭ).

В процессе исследования наблюдали некоторое несоответствие между данными титров антител и числа АОК селезенки, полученными в группе животных, получавших препарат сравнения: высокие показатели содержания суммарных иммуноглобулинов и IgG на 4 – 14 дни после введения антигена не соответствуют низким значениям числа АОК (рис. 1, 2, табл. 2). По-видимому, использование настойки эхинацеи приводит к мобилизации синтетических способностей АОК, существенно не влияя на процессы их пролиферации.

Изучению иммунотропных свойств лекарственных растений посвящено немало работ, в них очень редки сведения об активности эфиромасличных растений; в основном иммунокорригирующее действие на гуморальный иммунный ответ характерно для растительного сырья, содержащего полисахариды и сложные фенилпропаноиды [9]. Корригирующее влияние на гуморальный иммунитет в условиях иммунодепрессии известно для суммарных извлечений из сырья эфиромасличных растений флоры Индокитая [12, 13], которые стимулировали синтез антител-гемагглютининов в дозе 250 – 500 мг/кг. Следовательно, *C. geoides* является перспективным источником препаратов с иммунокорригирующим действием, активных в значительно меньшей дозе.

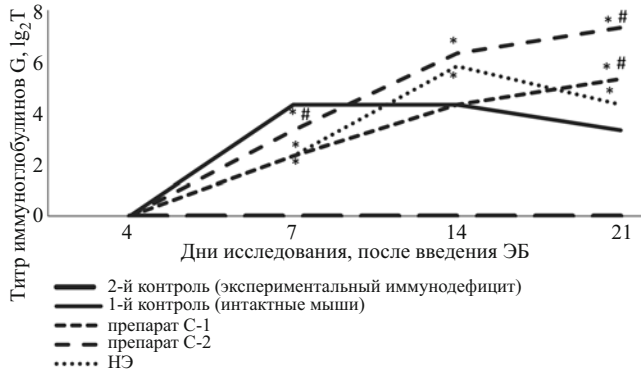

Рис. 2. Влияние препаратов *C. geoides* и настойки эхинацеи на титр иммуноглобулинов класса G к эритроцитам барана.

* $p \le 0{,}05$ — степень достоверности различия относительно контроля 1, $^{\#}$ — $p \le 0{,}05$ — степень достоверности различия относительно препарата сравнения (настойки эхинацеи).

ВЫВОДЫ

1. Препараты *C. geoides* (экстракты из корневищ с корнями и травы, полученные методом перколяции 40 и 70 % этанолом) оказывают корригирующее действие на гуморальный иммунный ответ и иммунопролиферативные процессы в селезенке мышей при экспериментальном иммунодефиците, вызванном циклофосфаном.

2. Исследуемые препараты *C. geoides* при введении в желудок в дозе 50 мг/кг в течение 5 сут (1 раз в день) оказывают стимулирующее действие на синтез специфических иммуноглобулинов и пролиферацию АОК селезенки в среднем на 21 – 43 % ($p = 0{,}001$ – $0{,}008$) более выраженное, чем настойка эхинацеи.

3. Препарат С-2 (экстракт из корневищ с корнями и травы *C. geoides*, полученный методом перколяции 70 % этанолом) наиболее перспективен для углубленного исследования с целью разработки нового эффективного иммунокорректора, так как в более ранние сроки (на 7 день после введения антигена), чем настойка эхинацеи, стимулирует синтез специфических иммуноглобулинов и превосходит ее по влиянию на пролиферацию специфических клонов АОК селезенки в среднем на 38 % ($p = 0{,}008$).

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Водолазова, А. В. Ткачев, *Материалы I (IX) международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге*, Санкт-Петербург (2006), с. 141.
2. Л. А. Балыкова, *Практ. мед.*, № 45, 137 – 140 (2010).
3. *Гемагглютинация и реакции антителозависимого гемолиза. Антитела. Методы*, кн. 1, Н. Р. Линг, Д. Кэтти (ред.), Мир, Москва (1991).
4. *Дикорастущие полезные растения России*, А. Л. Буданцев, Е. Е. Лесиовская (ред.), изд-во СПХФА, Санкт-Петербург (2001).

5. Л. В. Лусс, *Аллергол. и иммунол. в педиатрии*, **2**(11), 3 – 10 (2007).
6. М. А. Мяделец, С. В. Дутова, *Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты*, Москва (2012), сс. 616 – 620.
7. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Медицина, Москва (2005).
8. Н. В. Рязанцева, *Бюл. сиб. мед.*, № 2, 5 – 12 (2008).
9. *Фенилпропаноиды лекарственных растений*, В. А. Куркин (ред.), ООО "Офорт", Самара (2005).
10. А. А. Ярилин, *Иммунология*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2010).
11. A. J. Cunningam, *Nature*, **207**, 1106 – 1107 (1965).
12. M. Kannan, R. Singh, *World Applied Sci. J.*, **11**(5), 495 – 503 (2010).
13. I. K. Makhija L. Richard, S. P. Kirti, K. Saleemullah, et al., *Int. J. Pharm.*, **7**(2), 171 – 179 (2011).

Поступила 06.11.14

PRECLINICAL STUDY OF IMMUNOCORRECTION ACTION OF THE SUM OF ACTIVE SUBSTANCES OF *COLURIA GEOIDES* (PALL.) LEDEB. (ROSACEAE)

S. V. Dutova[1], M. R. Karpova[2], M. A. Myadelets[3], N. V. Myasnaya[4], and E. Yu. Sherstoboev[4]

[1] N. F. Katanov Khakassian State University, ul. Lenina 90, Abakan, Khakassia, 655017 Russia

[2] Siberian State Medical University, Moskovskii Trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

[3] Central Siberial Botanic Garden, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

[4] E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634028 Russia

A preclinical study of the immunocorrection action of the sum of active substances isolated from ethereal-oil plants *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (Rosaceae family) with respect to experimental immunodeficiency showed that preparations relieve symptoms of immunodeficiency caused by the administration of cyclophosphan: suppressed synthesis of anti-erythrocyte antibodies (agglutinine) and proliferative processes in the spleen. Under the influence of *C. geoides* preparations, the absolute numbers of cariocytes and antibody forming cells in spleen significantly increased (compared to the group of animals with experimental immunodeficiency) and in some cases reached the background level. The drugs studied produced a more pronounced stimulating effect on the synthesis of specific immunoglobulins and proliferation of antibody forming cells of spleen as compared to the effect of Echinacea tincture. Preparation C-2 (extract from underground organs and grass of *C. geoides* obtained by percolation method with 70% ethanol) is most promising for in-depth research and the development of new effective drugs with immunocorrecting properties.

Keywords: *Coluria geoides*; immunocorrection effect; immune deficiency; antierythrocyte antibodies; antibody forming cells of spleen.