

Е.Д. Будаева, В.Б. Хобракова

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *GENTIANA ALGIDA* PALL., НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНЬЕВ ИММУННОГО ОТВЕТА

ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ, Россия

В опытах на мышах линии СВА установлена иммуномодулирующая активность фракций, полученных из надземной части горечавки холодной, в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммунодепрессии. Показано, что испытуемые фракции (полисахаридная, этилацетатная, хлороформная, бутанольная) способны ослаблять супрессивное действие цитостатика азатиоприна на антителообразование и клеточноопосредованную иммунную реакцию, что выражается в повышении иммунологических показателей. Установлено, что наибольшей иммуномодулирующей активностью обладают этилацетатная и полисахаридная фракции горечавки холодной.

Ключевые слова: фракции горечавки холодной, полисахаридная фракция, этилацетатная фракция, хлороформная фракция, бутанольная фракция, иммуномодулирующее действие, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, азатиоприновая иммунодепрессия

INFLUENCE OF THE FRACTIONS ISOLATED FROM *GENTIANA ALGIDA* PALL. ON THE STATE OF CELLULAR AND HUMORAL CHAINS OF IMMUNE RESPONSE

Ye.R. Budaeva, V.B. Khobrakova

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia

The immune modulatory effect of fractions isolated from the aerial part of *Gentiana algida* Pall. has been established in experiments on the CBA mice in respect of cellular and humoral immune response at immune suppression caused by azathioprine. The introduction of test fractions (polysaccharide, ethyl acetate, chloroform, butanol) to mice increased the number of the antibody forming cells and index of hypersensitivity reaction of slow type compared with the level of suppression. The most immune modulating effect in respect of cellular and humoral immune response at immune suppression caused by azathioprine has polysaccharide fraction and an ethyl acetate fraction containing phenolic substances. The presence of marked immune modulating properties of the studied remedies in experimental immune suppression allow to recommend them for introduction into the medical practice for the prevention and treatment of immune deficiency conditions, as well as to conduct targeted search of new efficient and low-toxic immune correcting plant preparations.

Key words: fractions from *Gentiana algida* Pall., polysaccharide fraction, ethyl acetate fraction, chloroform fraction, butanol fraction, immune modulatory effect, humoral immunity, cellular immunity, azathioprine immune suppression

Иммуномодуляторы на сегодняшний день занимают прочные позиции в лечении заболеваний, связанных со снижением активности иммунного ответа организма. В связи с этим проводятся многочисленные исследования по поиску наиболее безопасных, с минимальными побочными эффектами иммунопротекторных средств, которыми являются фитопрепараты. Их действие характеризуется низкой токсичностью, они обладают мягким действием и влияют только на измененные звенья иммунной системы [4].

Ранее нами была установлена иммуномодулирующая активность сухого экстракта горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.) при экспериментальном иммунодефиците [1]. В настоящем исследовании представляет интерес изучить влияние фракций, выделенных из данного растения. Извлечения из горечавки холодной обладают противовоспалительными, антибактериальными свойствами [3, 8].

Целью настоящего исследования явилось определение иммуномодулирующего действия фракций, выделенных из надземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.), в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на мышах-самцах линии СВА массой 18–20 г. Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.) и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под легким эфирным наркозом.

Объектами исследования явились фракции, выделенные из горечавки холодной: полисахаридная (ПФ), этилацетатная фракция (ЭАФ), хлороформная фракция (ХФ) и бутанольная фракция (БФ). Действие фракций на показатели гуморального звена иммунитета было изучено на животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной азатиоприном в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней (контрольная группа). Исследуемые фракции вводили опытным группам животных на фоне азатиоприна перорально в виде водного раствора в следующих дозах: ПФ – 30 мг/кг, ЭАФ – 20 мг/кг, ХФ – 10 мг/кг, БФ – 70 мг/кг 1 раз в сутки в течение 14 дней.

Интактная группа животных получала очищенную воду по аналогичной схеме.

Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham [10].

Действие испытуемого средства на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), согласно стандартной методике локальной ГЗТ [7].

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. Для всех данных определяли среднее арифметическое значение (*M*), ошибку средней арифметической ($\pm m$) и значимость различий (*p*). Различия считали значимыми при вероятности 95 % ($p \leq 0,05$) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании влияния фракций горечавки холодной на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что испытуемые фракции восстанавливают индекс реакции ГЗТ (ИР ГЗТ) в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению ИР ГЗТ на 57 %, по сравнению с тем же показателем в интактной группе (табл. 1).

Таблица 1
Влияние фракций, полученных из горечавки холодной, на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

№ п/п	Группы животных	ИР ГЗТ, %
1	Интактная (<i>n</i> = 8)	33,5 $\pm$ 1,77
2	Контрольная (Азатиоприн) (<i>n</i> = 8)	14,3 $\pm$ 0,99
3	Азатиоприн + ЭАФ (<i>n</i> = 8)	24,8 $\pm$ 1,73*
4	Азатиоприн + ПФ (<i>n</i> = 8)	29,3 $\pm$ 1,77*
5	Азатиоприн + ХФ (<i>n</i> = 8)	17,2 $\pm$ 1,35
6	Азатиоприн + БФ (<i>n</i> = 8)	20,8 $\pm$ 0,81*

Примечание. Здесь и далее *n* – количество животных в группе; * – разница значима ($p \leq 0,05$), по сравнению с контролем.

При введении ЭАФ, ПФ, ХФ, БФ на фоне иммунодепрессии наблюдали увеличение ИР ГЗТ в 1,7, 2,0, 1,2 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с контролем. Исследуемые фракции можно расположить в порядке

убывания их иммуномодулирующей активности в отношении клеточного звена иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии следующим образом: ПФ > ЭАФ > БФ > ХФ.

При исследовании влияния фракций на процессы антителообразования установлено, что ЭАФ, ПФ, ХФ, БФ устраняют азатиоприновую иммуносупрессию (снижение абсолютного и относительного числа АОК на 56 %, по сравнению с данными в интактной группе), что проявляется в увеличении абсолютного количества АОК в 2,7, 2,5, 2,0 и 1,9 раза и при расчете на 10^6 спленоцитов – в 2,6, 2,4, 1,5 и 1,3 раза соответственно, по сравнению с контролем (табл. 2).

По степени убывания иммуномодулирующей активности в отношении гуморального звена иммунного ответа испытуемые фракции располагаются следующим образом: ЭАФ > ПФ > ХФ > БФ.

Таким образом, можно заключить, что этилацетатная, содержащая преимущественно полифенольные соединения, и полисахаридная фракции, выделенные из горечавки холодной, обладают выраженной иммуномодулирующей активностью в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа. Наши данные согласуются с данными ряда авторов, в работах которых установлена иммуномодулирующая активность полифенольных соединений и полисахаридов [2, 6, 9, 11, 12, 13]. Так, в работе А.Н. Евстропова с соавт. (2004) определено иммуномодулирующее действие водорастворимого полифенольного комплекса из пятилистника кустарникового [81]. Водный экстракт растения повышал число АОК селезенки мышей, иммунизированных эритроцитами барана, и стимулировал клеточный иммунный ответ. Исследования А.А. Чурина с соавт. (2005) в отношении полифенольного экстракта из бадана толстолистного выявили его нормализующий эффект на содержание АОК селезенки мышей при иммунодепрессии и стимуляции гуморального иммунитета. Полифенольный экстракт бадана снижал выраженность воспалительных процессов в условиях реакции ГЗТ, препятствуя накоплению Т-лимфоцитов в очаге воспаления и подавляя способность этих клеток продуцировать провоспалительные цитокины [9].

Полученные данные по выраженной иммуномодулирующей активности этилацетатной и полисахаридной фракций горечавки холодной аргументируют целесообразность их дальнейшего изучения с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

Таблица 2
Влияние фракций, полученных из горечавки холодной, на антителообразование

№ п/п	Группы животных	Абсолютное число АОК на селезенку	Число АОК на 10^6 спленоцитов
1	Интактная (<i>n</i> = 8)	97559 $\pm$ 7256,2	783 $\pm$ 50,8
2	Контрольная (Азатиоприн) (<i>n</i> = 8)	42498 $\pm$ 2852,9	337 $\pm$ 26,8
3	Азатиоприн + ЭАФ (<i>n</i> = 8)	117980 $\pm$ 7453,4*	886 $\pm$ 62,3*
4	Азатиоприн + ПФ (<i>n</i> = 8)	105771 $\pm$ 9218,8*	816 $\pm$ 41,0*
5	Азатиоприн + ХФ (<i>n</i> = 8)	87225 $\pm$ 6680,4*	509 $\pm$ 42,5*
6	Азатиоприн + БФ (<i>n</i> = 8)	80193 $\pm$ 4937,6*	450 $\pm$ 37,4*

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

1. Будаева Е.Р., Хобракова В.Б. Иммуномодулирующее действие сухого экстракта горечавки холодной // Труды межд. форума «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы». – Казань, 2014. – С. 48–49.

Budaeva YR, Khobrakova VB (2014). Immunomodulatory effect of the dry extract from *Gentiana algida* Pall. [Immunomodulirujushhee dejstvie suhogo jekstrakta gorechavki holodnoj]. *Klinicheskaja immunologija i allergologija – mezhdisciplinarnye problemy*, 48-49.

2. Евстропов А.Н., Бурова Л.Г., Орловская И.А. Противовирусная и иммуностимулирующая активность полифенольного комплекса, экстрагированного из пятилистника кустарникового (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz) // Вопр. вирусол. – 2004. – Т. 49, № 6. – С. 30–33.

Evdustropov AN, Burova LG, Orlovskaya IA (2004). Antienteroviral and immunopotentiating activity of polyphenolic complex extracted from the *Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz [Protivovirusnaja i immunostimulirujushhaja aktivnost' polifenol'nogo kompleksa, jekstragirovannogo iz pjatilistnika kustarnikovogo (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz)]. *Vopr. virusol.*, 49 (6), 30-33.

3. Корнопольцева Т.В., Хоцаев Ж.Ц., Асеева Т.А., Танхаева Л.М. Противовоспалительная и антимикробная активность *Gentiana algida* Pall и *Leucanthemum sibiricum* Dc. // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2007. – Т. 73, № 6. – С. 82–85.

Kornopol'tseva TV, Khotsaev ZT, Aseeva TA, Tankhaeva LM (2007). Anti-inflammatory and antimicrobial activity of *Gentiana algida* Pall and *Leucanthemum sibiricum* Dc. [Protivovospalitel'naja i antimikrobnaja aktivnost' *Gentiana algida* Pall i *Leucanthemum sibiricum* Dc.]. *Sibirskij medicinskij zhurnal (Irkutsk)*, 73 (6), 82-85.

4. Лазарева Д.Н., Плечев В.В., Моругова Т.В., Самигуллина Л.И. Растения, стимулирующие иммунитет. – Уфа, 2005. – 96 с.

Lazareva DN, Plechyov V.V., Morugova TV, Samigullina LI (2005). Immune stimulating plants [Rasteniya, stimulirujushhie immunitet], 96.

5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – 352 с.

Lakin GF (1990). Biometrics [Biometrija], 352.

6. Лигачёва А.А. Иммунофармакологические свойства полисахаридов полыни горькой, клевера лугового, березы повислой: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Томск, 2010. – 22 с.

Ligachyova AA (2010). Immunopharmacologic properties of polysaccharides from *Artemisia absinthium* L., *Trifolium pretense* L., *Betula pendula* Roth.: abstract of dissertation of Candidate of Biological Sciences [Immunofarmakologicheskie svojstva polisaharidov polyni gor'koj, klevera lugovogo, berezy povisloy], 22.

7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.

Khabriev RU (ed.) (2005). Manual on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv], 832.

8. Хоцаев Ж.Ц. Противовоспалительная активность сухого экстракта горечавки холодной *Gentiana algida* Pall. // Разработка и внедрение новых методов и средств традиционной медицины. – М., 2001. – С. 202–204.

Khotsaev ZT (2001). Anti-inflammatory activity of the dry extract from *Gentiana algida* Pall. [Protivovospalitel'naja aktivnost' suhogo jekstrakta gorechavki holodnoj *Gentiana algida* Pall.]. *Razrabotka i vnedrenie novyh metodov i sredstv tradicionnoj mediciny*, 202-204.

9. Чурин А.А., Масная Н.В., Шерстобоев Е.Ю., Суслов Н.И. Влияние экстракта *Bergenia crassifolia* на показатели специфического иммунного ответа в условиях экстремальных воздействий // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, № 5. – С. 51–54.

Churin AA, Masnaya NV, Sherstoboyev E.Y, Suslov NI (2005). Effect of the extract from *Bergenia crassifolia* on the indices of specific immune response in conditions of extreme impacts [Vlijanie jekstrakta *Bergenia crassifolia* na pokazateli specificheskogo immunnogo otveta v uslovijah jekstremal'nyh vozdeystvij]. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija*, 68 (5), 51-54.

10. Cunningham AJ (1965). A method of increased sensitivity for detecting single antibodyforming cells. *Nature*, 207 (5001), 1106-1107.

11. Schepetkin IA, Quinn MT (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.*, 6, 317-333.

12. Shin JY, Song JY, Yun YS (2002). Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 24, 469-482.

13. Xie G, Schepetkin IA, Quinn MT (2007). Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. *Int. Immunopharmacol.*, 7 (13), 1639-1650.

Сведения об авторах
Information about the authors

Будаева Евдокия Ринчиновна – аспирант лаборатории экспериментальной фармакологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-47-43; e-mail: evd_bud2688@mail.ru)
Budaeva Yevdokiya Rinchinovna – Postgraduate of the Laboratory of Experimental Pharmacology of the Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Sakhyanovoy str., 6, Ulan-Ude, Russia, 670047; tel.: +7 (3012) 43-47-43; e-mail: evd_bud2688@mail.ru)

Хобракова Валентина Бимбаевна – доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН

Khobrakova Valentina Bimbaevna – Doctor of Biological Sciences, Docent, Senior Research Officer of the Laboratory of Experimental Pharmacology of the Institute of General and Experimental Biology SB RAS