

На правах рукописи



ТУГАРИНА ЮЛИЯ АЛЕКСЕЕВНА
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ
ЭКСТРАКТА СУХОГО ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ
ЛЕВЗЕИ ОДНОЦВЕТКОВОЙ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Улан-Удэ – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Хобракова Валентина Бимбаевна – доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Ферубко Екатерина Владимировна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» / отдел экспериментальной фармакологии Центра доклинических исследований, заведующий

Убеева Елена Александровна – кандидат медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» Министерства науки и высшего образования РФ / кафедра инфекционных болезней медицинской школы, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «27» марта 2025 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 99.0.045.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ИМБТ СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: <http://igeb.ru>

Автореферат разослан «23» января 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент



В.Б. Хобракова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Современные эпидемиологические данные свидетельствуют о неуклонном увеличении числа больных с нарушениями функции иммунной системы (Кузьмина, 2017; Трошина, 2020; Шабашова, 2023; Chovancová, 2019; Tuano, 2021). Известно, что вторичная иммунная недостаточность не связана с генетическим блоком какого-либо звена иммунитета, а развивается под воздействием самых разнообразных повреждающих факторов. К данным факторам можно отнести применение медикаментозных средств, в том числе цитостатиков, антибиотиков и др., лучевое воздействие, неблагоприятную экологическую обстановку, острые или хронические стрессовые ситуации, нервно-эмоциональные перегрузки, заражение новыми и вновь появляющимися патогенами, в том числе вирусом SARS-CoV-2 и др. (Вознесенский, 2022; Bonagura, 2020; Karen, 2021; Tuano, 2021; Ballow, 2022). В связи с этим, продолжается поиск эффективных, экономически доступных методов лечения и профилактики вторичных иммунодефицитных состояний, в том числе, разработка новых безопасных и эффективных лекарственных иммуномодуляторов (Шур, 2019; Зупарова, 2021; Лупанова, 2021; Jantan, 2015; Stanescu, 2016; Li, 2017; Qian, 2017).

В настоящее время диапазон иммуномодуляторов представлен, в основном, синтетическими лекарственными средствами, широкодоступными на фармацевтическом рынке. Однако, большинство из них вызывает множество побочных эффектов, которые также усиливаются с течением времени, отрицательно влияют на организм и имеют строго направленное действие (Guo, 2018; Behl, 2021). Растительные иммуномодуляторы, наряду с высокой эффективностью, обладают более физиологичным и комплексным воздействием на организм, низкой токсичностью, отсутствием побочных реакций, а также широким спектром действия благодаря наличию в них биологически активных веществ (БАВ): фенольных соединений, полисахаридов, тритерпеноидов, экистероидов и др., обладающих выраженными иммуномодулирующими свойствами (Шахмурова, 2013; Куркин, 2015; Тимофеев, 2016; Zhou, 2018; Nagoo, 2021; Zebeaman et al., 2023). В связи с вышеизложенным, актуальным представляется поиск новых эффективных и безопасных иммуномодуляторов, созданных на основе растительного сырья, для включения их в комплексную фармакотерапию и профилактику иммунодефицитных состояний.

Одним из перспективных источников сырья для создания растительных иммуномодуляторов, обладающих высокой эффективностью и безопасностью, является травянистое растение левзея одноцветковая, *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC, семейство Астровых (*Asteraceae*), распространенное на территории Российской Федерации в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке (Оленников, 2018; Симонова, 2019; Skała, 2016). *R. uniflorum* широко используется в традиционной медицине Китая и Монголии как детоксикационное, противоопухолевое и тонизирующее средство, спиртовые настойки *R. uniflorum* обладают ноотропными и гепатопротекторными свойствами (Елизарова, 2017; Разуваева и др., 2020; Маркова и др., 2022; Оленников, 2022; Chen et al., 2017; Hu, 2022; Zhen, 2022). Экстракты, полученные из надземной и подземной частей *R. uniflorum*, проявляют адаптогенное действие

при эмоциональном и иммобилизационном стрессах; экстракт из листьев оказывает нейропротективное влияние; экстракт, выделенный из подземной части растения, восстанавливает параметры основных звеньев иммунной системы при азатиоприновой иммуносупрессии (Татарина, 2017; Хобракова и др., 2017; Разуваева, 2020; Шантанова и др., 2020, 2021; Маркова, 2022). В связи с этим, в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН разработан экстракт сухой из надземной части *R. uniflorum*, представляющий собой сумму экстрактивных веществ: экидистероидов, флавоноидов, фенилпропаноидов, полисахаридов, дубильных веществ, фенолкарбонных, оксикоричных кислот, тритерпеновых сапонинов, кумаринов и др. (Nikolaeva et al., 2014). Основными действующими веществами данного растения являются экидистероиды (экидистерон, рапонтистерон, 2-дезоксиде-20-гидроксиэкидизон), фенилпропаноиды и полисахариды, обладающие высокой биологической активностью, в том числе, иммуномодулирующими свойствами.

Данные литературы, касающиеся исследования спектра фармакологической активности извлечений *R. uniflorum*, относятся преимущественно к лекарственным средствам из корневищ растения в виде экстрактов и отваров (Olennikov, Kashenko, 2018). Представляет интерес исследовать экстракт лезвие одноцветковой, полученный из надземной части, а также выделенные из нее индивидуальные вещества на предмет наличия у них иммуномодулирующих свойств при экспериментальном иммунодефиците.

Степень разработанности проблемы. Российский фармацевтический рынок представлен более 70 наименованиями иммуномодуляторов / иммуностимуляторов. Более 80% от общего перечня иммуностимулирующих средств растительного происхождения составляют лекарственные средства из растений рода *Echinacea* (Дутова, 2016). Кроме того, многочисленными исследованиями доказано иммуностимулирующее действие извлечений из растений группы адаптогенов; наиболее изучены *Rhodiola rosea* и *Eleuterococcus centicosus* (Куркин и др., 2014).

Зарубежными учеными M. Zebeaman et al. (2023) идентифицировано 150 лекарственных растений для поиска новых иммуномодуляторов, среди которых первое место занимает семейство *Asteraceae*, представленное 18 видами растений (12%), далее *Apiaceae* (4,7%, 7 растений), *Fabaceae* (4%, 6 растений), *Araliaceae* (4%, 6 растений), *Cucurbitaceae* (3,3%, 5 растений) и *Orobanchaceae* (2,7%, 4 растения). В целом, из растений, изученных на предмет наличия иммуномодулирующей активности, 40% видов растений принадлежат к семейству *Asteraceae*. На международном фармацевтическом рынке известны следующие препараты традиционной индийской медицины, полученные на основе растительного сырья: «Vivartana», «Chyawanprash», «Brahma Rasayana», «IM-133» и «Septilin» (Zebeaman et al., 2023).

В последние годы проводятся исследования по поиску эффективных иммуномодуляторов среди дикорастущих и культивируемых растений, например, *Leuzea carthamoides*, *Taraxacum officinale*, *Matricaria recutita*, *Capsella bursa-pastoris*, *Nyctanthes abrortristis*, *Bassia longifolia*, *Gmelina arborea*, *Pterocarpus erinaceus* и др. (Игамбердиева, 2015; Дутова, 2016; Ивановский, 2017; Mahamat et al., 2018; Zimmermann-Klemd et al., 2019; Kumar, 2022). Кроме того, установлено иммуностимулирующее действие индивидуальных веществ (полисах-

харидов, фенольных соединений, фенилпропаноидов, экистероидов и др.), выделенных из лекарственных растений (*Lycium barbarum*, *Lycium ruthenicum*, *Helichrysum maracandicum*, *Plantago lanceolata*, *Astragalus membranaceus* и др.) (Секинаева, 2018; Ахмедова, 2022; Zhou et al., 2017; Ji et al., 2019).

Несмотря на многочисленные сведения литературы о наличии иммунотропных свойств извлечений из многих лекарственных растений, механизмы их действия изучены недостаточно (Борщук, 2016; Дутова, 2016; Маркова, 2019; Фроленок, 2023; Catanzaro et al., 2018; Zebeaman, 2023). В связи с чем, актуальным является разработка новых эффективных иммуномодуляторов растительного происхождения и оценка механизмов их действия.

Целью исследования явилось определение иммуномодулирующего действия экстракта сухого и выделенных индивидуальных соединений из надземной части *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC при экспериментальном иммунодефиците, вызванном циклофосфаном.

Для достижения указанной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1) определить влияние экстракта из надземной части *R. uniflorum* на гуморальный иммунитет у интактных животных и мышей, подвергнутых иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном;

2) оценить состояние клеточного звена иммунитета на интактных мышцах и мышцах с циклофосфан-индуцированной иммуносупрессией под влиянием экстракта *R. uniflorum*;

3) изучить влияние экстракта *R. uniflorum* на макрофагальный иммунитет интактных животных и на фоне иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном;

4) определить морфофункциональное состояние тимуса и селезенки мышей при введении экстракта *R. uniflorum* на фоне экспериментальной иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном;

5) изучить влияние биологически активных веществ, выделенных из надземной части *R. uniflorum*, на состояние основных звеньев иммунной системы при циклофосфановой иммуносупрессии;

6) определить антиоксидантные свойства экстракта *R. uniflorum* при циклофосфановой иммунодепрессии.

Научная новизна. В работе впервые установлена выраженная иммуномодулирующая активность экстракта сухого и БАВ из надземной части *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC при экспериментальном вторичном иммунодефиците, вызванном цитостатиком циклофосфаном. Показано, что курсовое внутривенное введение животным экстракта сухого *R. uniflorum* в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг ослабляет угнетающее действие циклофосфана, что проявляется в восстановлении показателей клеточного и гуморального иммунитета, а также функциональной активности макрофагов до уровня таковых у интактных животных. Введение экстракта *R. uniflorum* мышам на фоне иммуносупрессии, индуцированной циклофосфаном, уменьшает выраженность деструктивных процессов в тимусе и селезенке, вызванных введением цитостатика, способствует усилению пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Введение мышам, находящимся в состоянии циклофосфановой иммуносупрессии, выделенных из *R. uniflorum* индивидуальных веществ (5-*O*-кофеилхиновой кислоты, арабино-3,6-галактана и 20-гидроксиэкидизона) способствует восстановлению показателей иммунитета в

реакциях гиперчувствительности замедленного типа, антителиообразования и фагоцитоза перитонеальных макрофагов. Наиболее выраженное действие в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа проявляют арабино-3,6-галактан и 5-*O*-кофеилхинная кислота, а в отношении фагоцитоза - 20-гидроксиэкдизон.

Показано, что экстракт *R. uniflorum* не оказывает отрицательного влияния на процессы антителиообразования, выраженность реакций гиперчувствительности замедленного типа и фагоцитоза перитонеальных макрофагов, а также на пролиферативную активность ConA- и LPS-стимулированных лимфоцитов у интактных животных.

Иммуномодулирующее действие экстракта *R. uniflorum*, по-видимому, обусловлено его способностью стабилизировать мембраны иммунокомпетентных клеток и снижать в них интенсивность свободнорадикальных процессов, а также усиливать активность ферментов антиоксидантной системы.

Исследуемый экстракт *R. uniflorum* по своему действию не уступает такому референтного препарата - экстракта *Echinacea purpurea L.*

Практическая значимость работы. Полученные результаты исследований обосновывают целесообразность коррекции вторичных иммунодефицитов растительными средствами - экстрактом сухим из надземной части *R. uniflorum* и выделенными из нее индивидуальными веществами, что дает возможность рекомендовать их для создания новых эффективных и безопасных растительных иммуномодулирующих препаратов. Материалы исследований применяются в учебном процессе на кафедрах общей патологии человека; фармакологии, клинической фармакологии и фитотерапии медицинского института ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» Министерства науки и высшего образования РФ.

Основные положения, выносимые на защиту:

- экстракт из надземной части *R. uniflorum* не оказывает негативного влияния на показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа у интактных животных;

- применение экстракта из надземной части *R. uniflorum* у экспериментальных животных на фоне циклофосфан-индуцированного иммунодефицита способствует ослаблению угнетающего действия цитостатика, восстанавливая массу и клеточность иммунных органов - тимуса и селезенки, нивелируя показатели основных звеньев иммунного ответа (индексы реакции гиперчувствительности замедленного типа и «трансплантат против хозяина», абсолютное и относительное число АОК, фагоцитарный индекс), нормализуя морфологическую структуру тимуса и селезенки, при этом не уступая препарату сравнения - экстракту *Echinacea purpurea L.*;

- индивидуальные вещества из надземной части *R. uniflorum* (5-*O*-кофеилхинная кислота, арабино-3,6-галактан и 20-гидроксиэкдизон) повышают показатели гуморального, клеточного и макрофагального звеньев иммунной системы на фоне индуцированной циклофосфаном иммуносупрессии; наиболее выраженным действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа обладают арабино-3,6-галактан и 5-*O*-кофеилхинная кислота, а в отношении фагоцитоза макрофагов - 20-гидроксиэкдизон;

- экстракт *R. uniflorum* обладает выраженными антиоксидантными свойствами при циклофосфановой иммуносупрессии, снижая выраженность процессов свободнорадикального окисления биомакромолекул (содержание МДА) и повышая активность ферментов антиоксидантной защиты организма (каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы), что может быть одним из механизмов его иммуномодулирующего действия.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов исследований, а также адекватных приемов статистической обработки результатов.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на: IX International Research to Practice Conference “Traditional Medicine: Ways of Consolidation with Modern Health Care” (Улан-Уде, 2019); 5 Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (Москва, 2019); Международной научной конференции «Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе» (Иркутск, 2019); Международной научно-практической конференции «Курортная база и природные лечебно-оздоровительные местности Тувы и сопредельных регионов» (Кызыл, 2019); XIX межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2020); II международной научно-практической конференции «Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений» (Севастополь, 2020); Первом Национальном конгрессе по фитотерапии и траволечению (Москва, 2021); IV Всероссийской конференции с международным участием, посвященной Году науки и технологий в Российской Федерации и 40-летию Института общей и экспериментальной биологии СО РАН «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (Улан-Удэ, 2021); Всероссийской научно-практической конференции «Растительные адаптогены в восстановительной медицине» (Улан-Удэ, 2021); International symposium «Traditional Mongolian integrative medicine: development achievements, trends and prospects» (Ulaanbaatar, 2021); International symposium of Traditional Mongolian integrative medicine: development achievements, trends and prospects-II (Ulaanbaator, 2023); I Всероссийском конгрессе «Современные технологии сохранения здоровья населения Российской Федерации» (Москва, 2024).

Связь задач исследований с проблемным планом НИР. Работа выполнена в лаборатории экспериментальной фармакологии ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН в соответствии с задачами по проекту № 0337-2016-0006 «Биотехнологические основы и молекулярно-клеточные механизмы действия адаптогенных средств, созданных на основе экдистероидосодержащих растений Восточной Сибири».

Личный вклад автора. Автором диссертационной работы проведен поиск и анализ данных по заданной теме; планирование и проведение экспериментальных исследований, обработка, интерпретация и обсуждение результатов; подготовлены публикации по основным положениям диссертации; оформлена рукопись диссертации.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 3 - в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Структура и объем диссертации. Работа представлена на 148 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных экспериментальных исследований (3 главы), обсуждения результатов, заключения, выводов, библиографии, включающей 383 источника, 229 из них - на иностранных языках. Работа иллюстрирована 26 таблицами, 22 рисунками, в том числе микрофотографиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполнены на 160 инбредных мышах линии СВА, 740 мышах-гибридах F1 (СВАхС57В1/6) массой 18-20 г., 20 мышах Balb/С массой 20-22 г. из питомника РАМН Столбовая, а также 180 аутбредных белых крысах Wistar обоего пола с исходной массой 180-200 г. Содержание животных соответствовало Правилам надлежащей лабораторной практики (GLP) и Постановлению Правительства РФ N 855 от 13 июня 2020 г. Экспериментальная апробация и протокол исследования одобрен этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №1 от 23.01.2019 г.). Для эксперимента отбирали животных, которые соответствовали критериям включения в эксперимент, по принципу рандомизации они были разделены на группы по полу, возрасту, весу. Животных выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Иммуносупрессию вызывали циклофосфамидом. Для этого использовали препарат циклофосфан-ЛЭНС (ООО «ВЕРОФАРМ», лекарственная форма – лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения во флаконах), путем однократного внутривенного введения в максимально переносимой дозе 250 мг/кг в объеме 1,0 мл/мышь (Борсук, 2010; Масная, 2011).

Объектами исследований служили экстракт сухой из надземной части *R. uniflorum* и полученные из него индивидуальные соединения: фенилпропаноид 5-*O*-кофеилхинная кислота, полисахарид арабино-3,6-галактан и экдистероид 20-гидроксиэкдизон*. Трава *R. uniflorum* была собрана в период с июня по август 2018 г. в Селенгинском, Прибайкальском районах Республики Бурятия. Экстракт сухой и перечисленные вещества получены в лаборатории медико-биологических исследований Института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Для получения экстрактов измельченное сырье экстрагировали трехкратно последовательно 70, 40, 20 % спиртом этиловым при температуре 60°C. Спиртовые извлечения после экстракций упаривали, сепарировали и высушивали в вакуум-сушильном шкафу. При химическом анализе были получены следующие вещества: 5-*O*-кофеилхинная кислота, арабино-3,6-галактан и 20-гидроксиэкдизон. Выделение индивидуальных соединений из надземной части *R. uniflorum* проводили хроматографическими методами с применением колоночной хроматографии на оксиде алюминия (Ш), Сефадексе LH-20, обращено-фазовом силикагеле и препаративной ВЭЖХ для получе-

* Экстракт *R. uniflorum* и индивидуальные соединения получены в лаборатории медико-биологических исследований ИОЭБ СО РАН зав.лаб., д.фарм.н. Д.Н. Оленниковым

ния 5-*O*-кофеилхинной кислоты и 20-гидроксиэкдизона (Olennikov, 2018, 2019). Арабино-3,6-галактан выделяли из водного экстракта *R. uniflorum* после депротенинизации и диализа с последующим разделением методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (HCO₃--форма) и гель-хроматографии на Sephacryl 300-HR (Olennikov, 2018). Выход чистых соединений составил 2.5% для 5-*O*-кофеилхинной кислоты (чистота 95%), 0.53% для 20-гидроксиэкдизона (чистота 98%) и 3.5% для арабино-3,6-галактана.

Полученный экстракт сухой *R. uniflorum* вводили животным в виде водного раствора. По результатам предварительных экспериментальных исследований зависимости «доза-эффект» с использованием доз от 50 до 300 мг/кг была установлена экспериментально-терапевтическая доза экстракта - 100 мг/кг при введении его *per os* мышам, а также условно-терапевтические дозы индивидуальных веществ, выделенных из *R. uniflorum*, исходя из процентного содержания их в экстракте: 5-*O*-кофеилхинная кислота – 10 мг/кг, арабино-3,6-галактан – 3 мг/кг, 20-гидроксиэкдизон - 3 мг/кг путем внутривентрикулярного введения зондом 1 раз в сутки на протяжении 14 дней. Для сравнения был выбран препарат «Эхинацея» - эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) травы экстракт (ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия). Данное средство вводили животным перорально 1 раз в сутки в виде водного раствора в изоэффективной дозе 200 мг/кг в течение 14 дней. Контрольная группа животных с иммунодефицитом получала эквивалентный объем воды очищенной по аналогичной схеме. Острую токсичность экстракта сухого *R. uniflorum* исследовали по методу Кербера (Руководство..., 2012) путем однократного введения мышам экстракта внутривентрикулярно в дозах: от 250 до 1750 мг/кг с шагом в 250 мг. В течение 14 дней осуществляли наблюдение за поведением, общим состоянием мышей. В соответствии с классификацией К.К. Сидорова (1973) определяли класс токсичности. Определение относительной массы и количества ядросодержащих клеток (ЯСК) тимуса и селезенки проводили по общепринятой методике (Руководство...2012). По количеству антителообразующих клеток (АОК) оценивали состояние гуморального иммунитета животных (Cunningham, 1965). Выраженность клеточного иммунного ответа определяли по стандартной методике локальной гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (Руководство..., 2012) и реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) (Тессенев, 1979). Фагоцитарную активность исследовали в реакции фагоцитоза перитонеальных макрофагов (ПМ) мышей в отношении частиц коллоидной туши путем определения оптической плотности лизата клеток перитонеального экссудата на спектрофотометре «SECIL-2011» при длине волны 620 нм (Руководство... 2012). Исследование антигенпрезентирующей функции макрофагов проводили согласно методическим рекомендациям (Имельбаева, 1996). Пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов определяли с использованием МТТ-теста (Mosmann, 1983). Для активации Т-клеток использовали конканавалин А (ConA), В-клеток – липополисахарид (LPS). Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм с использованием микропланшетного фотометра Immunochem 2100 (USA). Результат выражали в процентах к контролю.

Влияние экстракта на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние эндогенной антиоксидантной системы в условиях циклофосамид-

индуцированного иммунодефицита оценивали путем определения в гомогенате селезенки белых крыс концентрации продукта ПОЛ - малонового диальдегида (МДА) (Камышников, 2017), активности супероксиддисмутазы (СОД) (Chevari, 1985), каталазы (Гирина, 1999) и глутатионпероксидазы (ГП) (Pinto, Bartley, 1969). Мембраностабилизирующую активность определяли методом перекисного гемолиза 1%-ной суспензии эритроцитов донорской крови (Ковалев, 1986). Антирадикальную активность оценивали по способности экстракта нейтрализовать радикалы 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) (Adesanwo, 2013) и 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS⁺) (Нугут З., 2017); по степени связывания супероксидного анионрадикала (O₂⁻) в неэнзиматической системе феназинметосульфат/НАДН (Rahini, 2014). Fe²⁺- хелатирующую активность экстракта сухого определяли с использованием о-фенантролинового метода (Оленников, 2008). В качестве веществ-сравнения использовали аскорбиновую кислоту и тролокс (SigmaAldrich, USA).

Для проведения патоморфологических исследований тимуса и селезенки животных декапитировали (под эфирным наркозом) на 16 сутки эксперимента. Иммунные органы фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин. Срезы, приготовленные на микротоме, окрашивали гематоксилином и эозином и азур-эозином (Коржевский, 2013). Морфометрические исследования гистологических срезов проводили с помощью программного обеспечения «ZEN 2012» к микроскопу «Axio LAB.A1» (Германия). На срезах тимуса измеряли: площадь дольки, ширину коркового вещества, толщину мозгового вещества, плотность клеток в субкапсулярной зоне и глубоких слоях коркового вещества, а также в мозговом слое. В субкапсулярной и центральной зонах коркового вещества подсчитывали число эпителиоретикулярных клеток, макрофагов, лимфобластов, больших, средних и малых лимфоцитов, клеток с фигурами митоза, а также деструктивно измененных клеток. В селезенке определяли площадь белой и красной пульпы.

Обработку полученных результатов исследования проводили по общепринятым статистическим методам для малой выборки, определяя среднюю величину (M) и ошибку (m). Значимость различий между данными групп определяли с помощью t-критерия Стьюдента при условии, что выборка имеет нормальное распределение. При вероятности 95% (P ≤ 0,05) различия между контрольными и опытными данными считались достоверными (Сергиенко, Бондарева, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При внутрибрюшинном введении изучаемого средства DL₅₀ составила 978,25 мг/кг массы животных. В соответствии с Классификацией токсичности веществ (по К.К. Сидорову), экстракт *R. uniflorum* можно отнести к группе «практически нетоксичные вещества».

Влияние экстракта *Rhaponticum uniflorum* на показатели иммунной системы интактных животных

По результатам проведенных исследований было установлено, что экстракт *R. uniflorum* в дозе 100 мг/кг не оказывает значительного влияния на

массу и число кариоцитов тимуса и селезенки мышей, показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунной системы, а также на пролиферативную активность Т- и В- лимфоцитов в сравнении с данными параметрами у интактных животных.

Влияние экстракта *R. uniflorum* на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов мышей линии Balb/c в МТТ-тесте оценивали в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл. Установлено, что добавление изучаемого экстракта не приводило к значимому изменению пролиферации LPS-активированных спленоцитов ни в одной из изучаемых концентраций. Следует отметить, что в концентрациях 10 и 100 мкг/мл наблюдалась статистически незначимая тенденция к увеличению пролиферации по сравнению с контрольными значениями. Добавление экстракта *R. uniflorum* в концентрации 100 мкг/мл снижало пролиферацию Соп-А-активированных клеток на 12 % по сравнению с контрольными значениями, тогда как в концентрациях 1 и 10 мкг/мл показатели были сравнимы с контролем.

Таким образом, экстракт сухой *R. uniflorum* не оказывает иммуноотоксического действия на функциональную активность основных звеньев иммунной системы организма, а также не влияет на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов. Аналогичное свойство характерно для экстрактов *Tribulus terrestris*, *Portulaca oleracea*, *Kalopanax pictus*, *Nelumbo nucifera* (Tilwari, 2013; Gahramanova, 2019; Park, 2022).

Влияние экстракта *Rhaponticum uniflorum* на состояние иммунной системы мышей, подвергнутых иммунодефициту, вызванному циклофосфаном

Проведенные исследования продемонстрировали, что экстракт *R. uniflorum* в дозе 100 мг/кг обладает иммуномодулирующим действием, что выразилось в достоверном увеличении массы и количества ЯСК тимуса и селезенки, показателей гуморального, клеточного и макрофагального звеньев иммунитета в условиях иммунодефицита, индуцированного циклофосфаном.

Введение циклофосфана в дозе 250 мг/кг приводило к достоверному снижению относительных масс тимуса и селезенки на 64% и 53% и уменьшению числа кариоцитов тимуса и селезенки на 30% и 36%, соответственно, по сравнению с данными в интактной группе. Введение экстракта *R. uniflorum* в дозе 100 мг/кг показало достоверное увеличение относительной массы тимуса и селезенки в 2,6 и 2,2 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе. Введение изучаемого экстракта также приводило к увеличению ЯСК тимуса и селезенки в 1,3 и 1,6 раза соответственно по сравнению с результатами в группах животных, получавших циклофосфан. При изучении влияния экстракта *E. purpurea* на относительную массу иммунокомпетентных органов отмечено, что масса тимуса и селезенки увеличилась в 2,0 и 2,4 раза, а число кариоцитов тимуса и селезенки - в 1,3 и 1,9 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе животных.

При оценке влияния экстракта *R. uniflorum* на функциональное состояние гуморального иммунитета при циклофосфановой иммуносупрессии установлено, что данное средство восстанавливает показатели гуморального иммунного ответа. В контрольной группе животных, получавших циклофосфан, абсолютное и относительное количество АОК уменьшилось на 32% и 23% соот-

ответственно по сравнению с данными в интактной группе. Введение экстракта *R. uniflorum* на фоне экспериментальной иммуносупрессии достоверно повысило количество АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10^6 спленоцитов в 1,5 и 1,7 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе. В группе животных, получавших экстракт *E. purpurea*, абсолютное и относительное количество АОК увеличилось в 1,5 и 1,3 раза по сравнению с контролем (Таблица 1). Подобное влияние на гуморальное звено иммунной системы характерно для экстрактов *Pistacia khinjuk*, *Enicostema axillare*, *Albizia procera*, *Coluria geoides* (Дутова и др., 2016; Saravanan, 2012; Pasala, 2022; Roqaya S., 2022).

Таблица 1 – Влияние экстракта *R. uniflorum* на состояние основных звеньев иммунного ответа организма при циклофосфановой иммуносупрессии у мышей

Показатели	Группы животных			
	Интактная, n=10	Контрольная (циклофосфан+H ₂ O), n=10	Опытная 1 (циклофосфан+экстракт <i>R. uniflorum</i>), n=10	Опытная 2 (циклофосфан+экстракт <i>E. purpurea</i>), n=10
Абсолютное число АОК на селезенку	74416±6202	50825±2757*	74622±1545**	76788±2153**
Число АОК на 10^6 спленоцитов	386,31±12,94	297,85±9,63*	521,15±45,86**	400,27±9,91**
Индекс реакции ГЗТ, %	46,98±2,47	34,33±1,86*	53,50±4,34**	50,08±4,50**
Индекс РТПХ	2,50±0,12	1,71±0,09*	3,03±0,04**	2,72±0,02**
Фагоцитарный индекс, оптическая плотность, усл.ед	0,328±0,023	0,226±0,011*	0,347±0,018**	0,338±0,023**

Примечание: здесь и далее: * – различия достоверны по сравнению с данными в интактной группе, ** – по сравнению с данными в контрольной группе при $p \leq 0,05$, n – число животных в группе.

При исследовании влияния экстракта *R. uniflorum* на состояние клеточного звена иммунной системы при циклофосфановой иммуносупрессии отмечалось его восстановление. Угнетение клеточного иммунитета под влиянием циклофосфана выражалось в снижении индекса реакции ГЗТ (ИР ГЗТ) на 27% по сравнению с результатами в интактной группе. Курсовое введение мышам экстракта *R. uniflorum* и экстракта *E. purpurea* привело к увеличению ИР ГЗТ в 1,6 и 1,5 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе (Таблица 1).

При введении циклофосфана наблюдалось угнетение клеточно-опосредованного иммунного ответа «трансплантат против хозяина», что выражалось в уменьшении соотношения клеточного содержания лимфатических

узлов контрольной и опытной лапок по сравнению с данными у интактной группы на 32%. При применении экстракта *R. uniflorum* на фоне иммуносупрессии отмечено достоверное повышение индекса увеличения лимфатических узлов в 1,8 раза; экстракт *E. purpurea* увеличил этот показатель в 1,6 раза по сравнению с контролем (Таблица 1). Аналогичный эффект в отношении клеточного звена иммунного ответа отмечен у экстрактов *Phlomis tuberosa*, *Pistacia khinjuk*, *Albizia procera*, *Silene jeniseensis*, *Serratula marginata* (Цыренова, 2017; Халзанова, 2022; Будацыренова, 2023; Pasala, 2022; Roqaya Salih, 2022).

Изучение фагоцитарной активности ПМ по отношению к коллоидным частицам туши показало, что в контрольной группе, получавшей циклофосфан, наблюдалось снижение фагоцитарного индекса на 31% по сравнению с результатами в интактной группе. Установлено, что после введения экстракта *R. uniflorum* отмечалось повышение фагоцитарного индекса в 1,5 раза по сравнению с данными в контрольной группе; в группе мышей, получавших препарат сравнения – экстракт *E. purpurea*, также происходило увеличение данного показателя в 1,5 раза по сравнению с контролем (Таблица 1).

При исследовании влияния экстракта *R. uniflorum* на антигенпрезентирующую функцию макрофагов в условиях циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии также установлено его стимулирующее влияние. При переносе интактным мышам клеток перитонеального экссудата от мышей-доноров, которым вводили эритроциты барана (ЭБ) и циклофосфан, отмечали подавление гуморального иммунного ответа, что проявлялось снижением количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10^6 спленоцитов в 1,6 и 1,5 раза соответственно по сравнению с данными в интактной группе. В группе мышей, которым вводили исследуемый экстракт иммунизированным мышам-донорам, подвергшимся действию циклофосфана, и переносили от них перитонеальные макрофаги сингенным мышам-реципиентам, наблюдали увеличение абсолютных и относительных показателей АОК в 1,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с параметрами в группе животных, получавших циклофосфан. При использовании экстракта *E. purpurea* наблюдали увеличение абсолютного и относительного числа АОК в среднем в 1,6 раза по сравнению с контролем (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние экстракта *R. uniflorum* на антигенпрезентирующую функцию макрофагов мышей на фоне циклофосфана

Группы животных	Количество АОК	
	на селезенку	на 10^6 спленоцитов
Интактная, n=10	51610±2688	402±22
Контрольная (Циклофосфан), n=10	31998±2009*	262±14*
Опытная1 (Циклофосфан+экстракт <i>R. uniflorum</i>), n=10	55467±3667**	416±27**
Опытная 2 (Циклофосфан+экстракт <i>E. purpurea</i>), n=10	51517±2535**	419±20**

Полученные нами результаты о стимуляции функциональной активности макрофагов находят подтверждение в работах Н.П. Тимофеева (2000) по

исследованию препарата «Биоинфузин», полученного из *Rhaponticum carthamoides*, О.С. Борсук и др. (2010) по изучению экстракта *Scutellaria baicalensis*, D.U. Putri et al. (2018) - водного экстракта *Phyllanthus niruri*, S.H. Hong et al. (2017) - экстракта *Cervus nippon mantchuricus*.

Результаты патоморфологических исследований показали, что на фоне введения циклофосфана наблюдается выраженная гипоплазия тимуса, характеризующаяся снижением массы органа, площади его коркового и мозгового вещества, а также уменьшением плотности клеток. При микроскопическом изучении тимуса контрольных животных выявлено, что строма органа отечная, капсула разволокнена, и в ней отмечаются адипоциты (Рисунок 1). По данным морфометрических исследований средний размер капсулы в контроле на 39% превышает интактный показатель (Рисунок 2). В мозговом веществе наблюдаются дилатация и кровенаполнение сосудов. Паренхима органа имеет однотонный цвет, граница между корковой и мозговой зонами нечеткая (Рисунок 1), вследствие снижения количества тимоцитов в корковом (на 21-29%) и увеличения клеточной инфильтрации в мозговом слое (на 20%) (Рисунок 3).

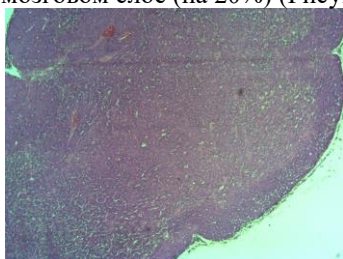


Рисунок 1 – Циклофосфановая иммуносупрессия. Тимус мыши контрольной группы. Наблюдается разволокнение капсулы органа, кровенаполнение сосудов. Граница между корковой и мозговой зонами нечеткая. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10, об. 5

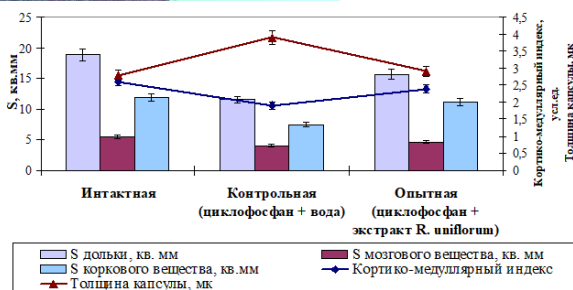


Рисунок 2 – Влияние экстракта *R. uniflorum* на морфометрические показатели тимуса мышей при циклофосфановой иммуносупрессии

Данные морфометрических исследований свидетельствуют, что однократное введение циклофосфана способствует снижению площади тимуса на 39% ($p \leq 0,05$) относительно таковой у животных интактной группы (Рисунок 2). При этом снижение размеров тимуса происходит, в основном, за счет уменьшения размеров коркового вещества (на 37%, $p \leq 0,05$), чем мозгового вещества (на 25%). Кортико-медулярный индекс в контроле составляет $1,9 \pm 0,53$, что на 24% ниже показателя в интактной группе. Данные результаты свидетельствуют об акцидентальной инволюции тимуса и соответствуют результатам других авторов, показавших, что введение цитостатиков способствует уменьшению размеров органа, инверсии слоев и

снижению плотности клеток, за счет усиления процессов некроза и апоптоза тимоцитов, а также снижения их пролиферации и дифференцировки (Бобрышева, 2013; Железнов, 2015; Лебединская и др., 2016).

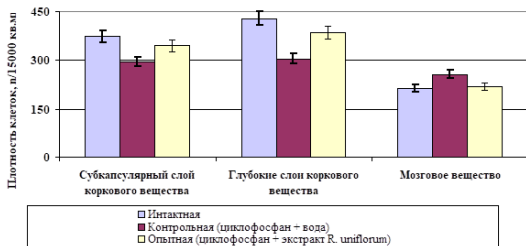


Рисунок 3 – Влияние экстракта *R. uniflorum* на плотность клеток в тимусе мышей при циклофосфановой иммуносупрессии

При анализе клеточного состава коркового вещества установлено, что введение цитостатика способствует снижению пролиферативной активности тимоцитов и усилению процессов апоптоза и некроза (Рисунок 4). Так, в субкапсулярной и средней зонах коры тимуса контрольных животных количество blastов снижается на 80 и 54%, больших лимфоцитов – на 71 и 73%, число деструктивно измененных клеток увеличивается в 2,8 и 2,4 раза соответственно по сравнению с таковыми показателями у интактных животных. Количество макрофагов в корковом веществе контрольных животных повышается в 2,3-2,6 раза по сравнению с данными в интактной группе, что свидетельствует об активации макрофагальной реакции.

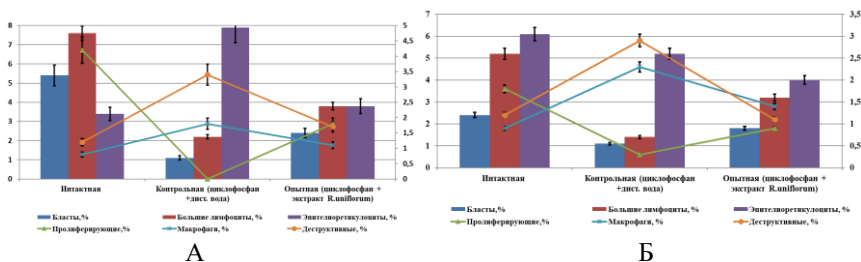


Рисунок 4 – Влияние экстракта *R. uniflorum* на клеточный состав коркового вещества тимуса мышей при циклофосфановой иммуносупрессии: А – субкапсулярная зона; Б – средние слои

Установлено, что курсовое введение животным экстракта *R. uniflorum* ограничивает акцидентальную инволюцию тимуса и ускоряет в нем репаративные процессы. Так, у мышей, которым вводили экстракт *R. uniflorum*, общая площадь дольки тимуса увеличивается на 37% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольным показателем, в основном, за счет увеличения площади коркового вещества (на 48%; $p \leq 0,05$). Кортико-медуллярный индекс составляет $2,43 \pm 0,22$, что на 26% выше такового в контрольной группе (Рисунок 2). Вследствие увеличения количества плотности тимоцитов в субкапсулярной зоне (на 17%) и в средних слоях коркового вещества (на 27%), а также снижения данного показателя в мозговом веществе (на 14%) относительно контроля

(Рисунок 3), кортико-медуллярная граница выглядит четкой, «инверсии слоев» не отмечается ни у одного животного опытной группы (Рисунок 5). Увеличение плотности клеток в корковом веществе тимуса животных опытной группы обусловлено усилением репаративных и снижением деструктивных процессов (Рисунок 4). Так, у животных, получавших исследуемый экстракт, в субкапсулярной области и средних слоях коркового вещества увеличивается количество пролиферирующих лимфоцитов (в 6,0 и 3,0 раза), бластов (в 2,2 и 1,6 раза) и больших лимфоцитов (в 1,7 и 2,3 раза), а также снижается число деструктивных клеток (в 2,0 и 1,6 раза) и макрофагов (на 39 и 32% соответственно) по сравнению с показателями контрольных животных. Наши результаты находят подтверждение в работе С.А. Витязевой и др. (2011), в которой установлено, что введение белым мышам арабиногалактана из лиственницы сибирской в сочетании с *Yersinia pestis* Ev способствует активации пролиферативных процессов в тимусе. По-видимому, за счет арабино-3,6-галактана, содержащегося в экстракте *R. uniflorum*, обеспечивается его нормализующее влияние на структуру тимуса мышей.



Рисунок 5 – Тимус мыши, получавшей экстракт *R. uniflorum* на фоне циклофосфана. Кортико-медуллярная граница выглядит четкой, «инверсия слоев» не наблюдается. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10, об. 20

Микроскопические исследования показали, что селезенка мышей покрыта фиброзной капсулой и перитонеальным мезотелием; от фиброзной капсулы отходят соединительнотканые трабекулы, пронизывающие паренхиму органа, в состав которой входят красная и белая пульпа. Последняя представляет собой совокупность лимфоидных фолликулов темно-синего цвета и составляет в среднем одну третью часть от общей площади органа. У всех животных интактной группы в лимфоидных фолликулах хорошо выражен центр размножения, периартериальная лимфоидная муфта, четко ограниченные мантийной зоной из малых лимфоцитов.

Однократное введение токсической дозы циклофосфана способствует формированию структурных изменений в селезенке, характеризующихся гемодинамическими нарушениями и инволюцией белой пульпы селезенки. Так, у животных контрольной группы относительный объем белой пульпы составляет $17,6 \pm 1,38\%$ от общей площади органа, против $29,4 \pm 2,96\%$ в интактной группе. Центры размножения не выявляются ни у одного животного контрольной группы. Вследствие снижения пролиферативной активности лимфоцитов и их апоптоза снижается плотность клеток, и окраска фолликула становится светлой и однородной. В лимфоидных фолликулах нет четкого разграничения на мантийную и маргинальную области. Аналогичные результаты получены другими исследователями (Кашенко, Золотаревская, 2011; Бобры-

шев, 2015), показавшими, что цитостатики оказывают лимфотоксическое действие, характеризующееся клеточным опустошением лимфоидных органов у лабораторных животных, уменьшением соответствующих зон распределения лимфоцитов и плотностью клеточного инфильтрата.

У животных опытной группы, получавших экстракт *R. uniflorum*, структурные изменения в селезенке менее выражены, чем у контрольных животных. Общая площадь белой пульпы выше на 39%, чем в контроле. Лимфоидные узелки имеют правильную овальную или округлую форму с формирующимися в них центрами размножения. У 50% животных единично встречаются вторичные лимфоидные узелки, с четким разделением на зоны.

Наши результаты согласуются с данными ряда авторов, установивших восстановление морфологических показателей иммунных органов в условиях экспериментального иммунодефицита под влиянием экстрактов, выделенных из *Rhizophora apiculata*, *Gentiana algida*, *Phlomis tuberosa*, *Astragalus propinquus*, *Panax ginseng*, *Silene jeniseensis*, *Nelumbo nucifera*, *Kalopanax pictus*, *Serratula marginata* (Будаева, 2016; Цыренова, 2017; Батоева, 2019; Халзанова, 2022; Будацыренова, 2023; Prabhu, Guruvayoorappan, 2012; Liu et al., 2019; Park et al, 2022).

Поскольку окислительный стресс лежит в основе различных патологических состояний, в настоящее время особое внимание уделяется достижениям в области природных антиоксидантов. Окислительный стресс опосредован активными формами кислорода (АФК) и вызван дисбалансом между выработкой свободных радикалов и активностью антиоксидантной защиты.

По результатам исследования установлено, что введение циклофосфана усиливает интенсивность процессов ПОЛ. Так, в гомогенате селезенки белых крыс отмечено повышение содержания МДА в 3,1 раза и снижение активности ферментов эндогенной антиоксидантной системы (активность СОД и ГП снизилась в среднем в 1,8, каталазы – 2,1 раза) по сравнению с данными в интактной группе. Состояние животных опытной группы, получавших экстракт *R. uniflorum* на фоне циклофосфана, характеризовалось снижением выраженности оксидативного стресса, что выражалось в уменьшении содержания МДА в 1,8 раза; повышении ферментативной активности СОД и каталазы в 1,6 раза, ГП - 1,4 раза по сравнению с контролем (Таблица 3).

Таблица 3 – Влияние экстракта *R. uniflorum* на интенсивность окислительного стресса в селезенке белых крыс при циклофосфановой иммуносупрессии

Группа животных	МДА, мкмоль/г ткани	СОД, мкмоль/мин/ мг белка	Каталаза, мкмоль/мин/ г ткани	ГП, нмоль/мин/ мг белка
Интактная, n=10	5,44±0,21	41,05±2,15	120,11±3,12	12,10±0,32
Контрольная (Циклофосфан +H ₂ O), n=10	17,10±1,10*	22,60±1,14*	57,20±2,41*	6,82±0,21*
Опытная (Циклофосфан +экстракт <i>R. uniflorum</i>), n=10	9,42±0,33**	35,94±0,33**	91,83±3,15**	9,53±0,25**

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с данными в интактной группе, ** – по сравнению с данными в контрольной группе при $p \leq 0,05$, n – число животных в группе.

Таким образом, экстракт *R. uniflorum* способствует повышению антиоксидантного статуса организма, снижает выраженность оксидативного стресса при циклофосфановой иммуносупрессии.

В исследованиях *in vitro* установлено, что экстракт из надземной части *R. uniflorum* обладает мембраностабилизирующей активностью при перекисном ($IC_{50}=605,00$ мкг/мл) и осмотическом воздействии на плазмалемму эритроцитов ($IC_{50}=75,20$ мкг/мл). Выявленная биологическая активность экстракта обусловлена, по-видимому, его способностью блокировать течение свободно-радикальной реакции Фентона, сохраняя тем самым структурно-функциональную активность плазматической мембраны. В условиях осмотического гемолиза исследуемый экстракт также предотвращал разрушение эритроцитов, что обусловлено, вероятно, поддержанием им изотонических условий в реакционной среде.

Предполагаемый антирадикальный механизм действия экстракта *R. uniflorum* показан в условиях *in vitro*: DPPH[•] ($IC_{50}=57,10$ мкг/мл), ABTS^{•+} ($IC_{50}=93,10$ мкг/мл). Кроме того, экстракт проявлял значительный хелатирующий эффект в отношении ионов Fe²⁺ ($IC_{50}=701,20$ мкг/мл) и оказывал протективное действие по отношению к полипептидам, предупреждая их окисление ($IC_{50}=720,15$ мкг/мл) (Таблица 4).

Таблица 4 – Антиокислительная активность экстракта *R. uniflorum in vitro*, IC_{50} мкг/мл

Объект	Реакционно-активные молекулы				
	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	O ²⁻	Fe (II)	Fe (II)/OH [•] (МБС-ЖПП)
Экстракт <i>R. uniflorum</i>	57,10±2,12	93,10±34,25	104,11±11,32	701,20±13,21	720,15±10,51
АК ^a	5,60±0,32	-	128,31±7,03	132,11±5,22	256,00±9,42
Тролокс ^a	2,10±0,11	51,33±1,14	-	-	-

Примечание. ^a - вещество сравнения; АК – аскорбиновая кислота

Антирадикальное действие экстракта обусловлено наличием в его составе экидистероидов (экидистерон, рапонтистерон, 2-дезоксиде-20-гидроксиэкидизон), флавоноидов, полисахаридов, фенолкарбоновых кислот и фенилпропаноидов (Куркин, Поройков, 2015; Panche et al., 2016; Olennikov, 2018; Bendimerad-Moultas et al., 2020; Das, 2020). Данные по установлению антирадикальной активности фенольных соединений из экстракта *Hypericum wightianum*, полученные в работе В. Balaperiasamy (2014), и оксикоричных кислот (феруловой и хлорогеновой), продемонстрированные в исследованиях А.А. Машенцевой (2010), позволяют предположить, что за антиоксидантное и антирадикальное действия экстракта *R. uniflorum* ответственны содержащиеся в нем, преимущественно, фенольные соединения (5-О-кофеилхинная кислота). Кроме того, реализация указанных видов активности испытуемого экстракта связана с наличием в его составе полисахаридов (арабино-3,6-галактан) и экидистероидов (экидистерон, рапонтистерон, 2-дезоксиде-20-гидроксиэкидизон), что согласуется с данными ряда авторов (Куркин, Поройков, 2015; Panche et al., 2016; Olennikov, 2018; Bendimerad-Moultas et al., 2020; Das, 2020).

Наши данные согласуются с результатами ряда работ, в которых также установлены антиоксидантная и антирадикальная активности экстрактов *Rubus chamaemorus*, *Leuzea conifera*, *Portulaca oleracea*, *Echeveria craigiana*, *Echeveria kinnachii* и *Echeveria subrigida* (Стах и Игнатовец, 2021; Barbosa, et al., 2018; Gahramanova, 2019; Rahimi et al., 2019; Lekouaghet et al., 2020; López-Angulo et al., 2022).

Оценка иммуномодулирующих свойств индивидуальных соединений, выделенных из надземной части *Rhaponticum uniflorum*, на фоне иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном

При исследовании влияния 5-*O*-кофеилхинной кислоты, арабино-3,6-галактана и 20-гидроксиэкдизона из надземной части *R. uniflorum* на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что индивидуальные вещества восстанавливают индекс данной реакции в условиях циклофосфановой иммуносупрессии. Введение циклофосфана приводило к снижению ИР ГЗТ на 27% по сравнению с тем же показателем в интактной группе. После введения животным опытной группы, подвергшимся иммунодепрессии, 20-гидроксиэкдизона, 5-*O*-кофеилхинной кислоты и арабино-3,6-галактана отмечалось увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,2, 1,3, 1,4 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе (Рисунок 6).

При исследовании влияния индивидуальных веществ на процессы антителообразования установлено, что извлечения повышают показатели гуморального иммунного ответа в условиях циклофосфановой иммуносупрессии. Введение циклофосфана приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и числа АОК на 10⁶спленоцитов на 35% и 28% соответственно по сравнению с теми же показателями в интактной группе. При введении 20-гидроксиэкдизона, 5-*O*-кофеилхинной кислоты и арабино-3,6-галактана из надземной части *R. uniflorum* на фоне иммуносупрессии отмечали достоверное увеличение количества АОК в абсолютных значениях в 1,4, 1,7 и 1,7 раза соответственно, а при расчете на 10⁶спленоцитов – в 1,3, 1,6 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 6).

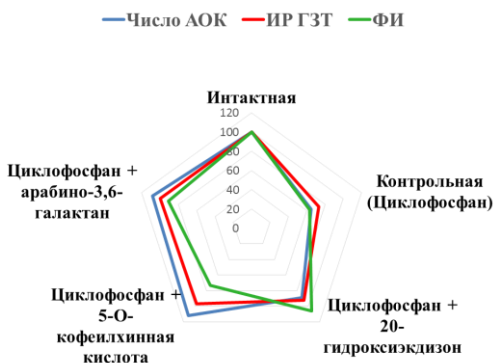


Рисунок 6 – Влияние 20-гидроксиэкдизона, 5-*O*-кофеилхинной кислоты и арабино-3,6-галактана *R. uniflorum* на состояние иммунной системы организма при циклофосфановой иммуносупрессии (% стимуляции относительно интактной группы животных – 100%)

При оценке влияния индивидуальных веществ на фагоцитарную активность ПМ в отношении частиц коллоидной туши было установлено, что наибольшее стимулирующее влияние на данное звено оказывает экдистероид 20-гидроксиэксдизон, увеличивая фагоцитарный индекс в 1,7 раза по сравнению с группой животных, получавших циклофосфан; в группе мышей, получавших арабино-3,6-галактан, наблюдалось увеличение индекса в 1,4 раза, и наименьшее стимулирующее влияние отмечалось в группе животных, получавших фенилпропанол 5-*O*-кофеилхиновая кислота (увеличение в 1,3 раза) (Рисунок 6).

В ходе изучения влияния индивидуальных веществ из *R. uniflorum* (фенилпропанол 5-*O*-кофеилхиновой кислоты, полисахарида арабино-3,6-галактана и экдистероида 20-гидроксиэксдизона) на процессы антителообразования, клеточно-опосредованную иммунную реакцию ГЗТ и фагоцитоз макрофагов установлено, что данные вещества восстанавливают показатели основных звеньев иммунного ответа в условиях циклофосфановой иммуносупрессии; наиболее выраженным действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа обладают арабино-3,6-галактан и 5-*O*-кофеилхиновая кислота, а 20-гидроксиэксдизон более эффективен в отношении фагоцитоза макрофагов. Известно, что полисахариды, выделенные из растений, увеличивают количество иммуноглобулинов в крови и активируют гуморальный иммунитет (Yu, 2018; Chu et al., 2019; Ma, 2019; Niu et al., 2020; Nam, 2022; Zhang et al., 2022). В механизме иммуномодулирующей активности полисахаридов особое значение имеет способность индуцировать синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального ряда, способствующих экспрессии молекул адгезии, выходу нейтрофилов в воспалительный очаг, активации NK-клеток, усилению фагоцитоза и продукции супероксидных радикалов, ускорению пролиферации лимфоцитов, а также увеличению синтеза IFN γ натуральными киллерами (Кусайкин и др., 2014; Bhatia et al., 2008; Leonard et al., 2012). Иммуномодулирующее действие растительных полисахаридов на функциональную активность макрофагов, в основном, реализуется за счет их пролиферации, изменения ими секреции цитокинов, стимуляции образования АФК и фагоцитарной активности. Известно, что полисахариды могут влиять на поляризацию лимфоцитов через соответствующую активацию антигенпрезентирующих клеток. Растительные полисахариды стимулируют продукцию NO и провоспалительных цитокинов макрофагами через активацию NF- κ B/Rel, стимулируют синтез различных цитокинов макрофагами, вызывают быструю деградацию I κ B α , стимулируя NF- κ B, повышают экспрессию TLR4 (Генералов, 2015; Лигачёва и др., 2022; Chen, 2014; Li, 2017; Yin, 2019). Данные многочисленных экспериментальных исследований демонстрируют иммуномодулирующие свойства полисахаридов растительного происхождения и согласуются с нашими данными. Так, при экспериментальной иммуносупрессии, вызванной циклофосфамидом, установлено восстановление основных звеньев иммунитета под влиянием полисахаридов *Malus halliana*, *Apios americana*, *Paeonia suffruticosa*, *Onosma hookeri*, *longiforum duthie*, *Schisandra chinensis*, *Phlomis tuberosa*, *Lycium ruthenicum*, *Lonicera japonica*, *Silene jenseisensis*,

Serratula marginata (Цыренова, 2017; Халзанова, 2022; Будацыренова, 2023; Gong et al., 2015; Yu, 2018; Chu et al., 2019; Ma, 2019; Niu et al., 2020; Nam, 2022; Zhang et al., 2022).

Фенольные кислоты в последнее время привлекли к себе значительное внимание в связи с их различными фармакологическими эффектами. В наших исследованиях фенилпропаноид 5-*O*-кофеилхинная кислота оказывает стимулирующее влияние на все звенья иммунной системы. Известно, что фенольные соединения, обладая иммуномодулирующей активностью, способны как стимулировать, так и угнетать продукцию оксида азота в культуре клеток, снижать уровень провоспалительных цитокинов интерлейкина (ИЛ)-2, интерферона (ИФН)- γ и подавлять секрецию TNF- α , оказывая протективный эффект при Соп-А-индуцированном иммунном повреждении печени. Фенольные соединения группы проантоцианидинов, ингибируя синтез ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-12p70, и, напротив, активируя синтез ИЛ-10, селективно подавляют поляризацию наивных Т-лимфоцитов по Th1-типу иммунного ответа (Филиппенко, 2012; Гайибов и др., 2018; Абдуллаева и др., 2019; Ягольник, 2019; Vulić, 2016; Zhou et al., 2017; Li et al., 2019). По данным M. Zebeaman et al. (2023) иммуностимулирующая активность полифенолов обусловлена ингибированием генерации iNOS в LPS-активированных макрофагах. Положительное влияние хлорогеновых кислот на иммунную систему обусловлено их выраженными противовоспалительными свойствами за счет активации сигнальных путей MAPK/ERK/JNK (Gao et al., 2019). Наши результаты находят подтверждение в работах P.S. Chauhan (2012), R.P. Sranujit (2021), J. Kzhyshkowska (2022), N. Moussavi (2022), T. Gu et al (2023), в которых экспериментально установлены иммуномодулирующие свойства хлорогеновых кислот из *Nelumbo nucifera*, *Sideritis scardica*.

Экдистероиды проявляют свое действие за счет наличия адаптогенных и иммунопротекторных свойств, подавления активации сигнальных путей MAPKs, Akt.; стимулируют ферментативные и неферментативные системы антиоксидантной защиты, способствующие снижению количества АФК в форме супероксидных и гидроксильных радикалов и снижению содержания МДА, а также индуцируют биосинтез белка и модулируют синтез углеводов и липидов (Bajguz, 2015; Thiem, 2017; Arif, 2022). Полученные нами результаты находят подтверждение в ряде работ. В частности, Г.А. Шахмуровой (2013) установлено иммуномодулирующее действие экдистероидсодержащих препаратов силекбин и аюстан, полученных из *Silene brahuica* и *Ajuga turkestanica*, в отношении первичного антителообразования у интактных животных и при моделировании вторичных иммунодефицитов (острый токсический гепатит, облучение в сублетальной дозе). Результаты экспериментов И.Д. Бобаева (2012) показали, что введение животным одновременно с иммунизацией ЭБ бутанольного экстракта экдистероидов *S. viridiflora* стимулировало процесс антителообразования. В исследованиях А.В. Халзановой (2022) и А.Ц. Будацыреновой (2023) также отмечено стимулирующее влияние экдистероидов, полученных из наземной части *Silene jeniseensis* и *Serratula marginata*, на показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа при

циклофосфановой иммуносупрессии.

При сравнительной оценке иммунокорректирующей активности экстракта *R. uniflorum* с действием референтного препарата - экстракта *E. purpurea* установлено, что исследуемый экстракт по своему эффекту не уступает препарату сравнения, а также, как и экстракт *E. purpurea*, не оказывает иммуно-токсического влияния на показатели реакций гуморального, клеточного и макрофагального звеньев иммунной системы у интактных мышей. Данное свойство характерно для группы иммуномодуляторов, восстанавливающих угнетенные функции иммунной системы до уровня нормы. Ведущими БАВ *E. purpurea* являются фенилпропаноиды – производные коричной кислоты, полисахариды и алкиламины (Proksch, A., 1987). По-видимому, за счет указанных веществ обеспечивается иммуномодулирующее действие экстракта *E. purpurea*, что согласуется с нашими результатами, показавшими наибольший вклад фенилпропаноида - 5-*O*-кофеилхинной кислоты и полисахарида - арабино-3,6-галактана в эффективность экстракта *R. uniflorum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе установлена выраженная иммуномодулирующая активность экстракта сухого из надземной части левзеи одноцветковой в условиях циклофосфан-индуцированной иммуносупрессии. Внутривенное введение мышам экстракта *R. uniflorum* в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг на фоне иммунодефицита способствует восстановлению показателей клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунной системы до уровня таковых у интактных животных, что проявлялось в увеличении индексов реакций ГЗТ и РТПХ, абсолютного и относительного числа АОК, фагоцитарного индекса и стимуляции антигенпрезентирующей функции макрофагов. При оценке влияния экстракта *R. uniflorum* на морфофункциональное состояние тимуса и селезенки на модели иммунодефицита установлено снижение в них деструктивных процессов, вызванных циклофосфаном, усиление пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. На фоне введения мышам, подвергнутым иммунодепрессии, выделенных из надземной части *R. uniflorum* индивидуальных веществ (фенилпропаноида 5-*O*-кофеилхинной кислоты, полисахарида арабино-3,6-галактана и экидистероида 20-гидроксизекдизона), наблюдали их стимулирующее влияние на клеточное и гуморальное звенья иммунного ответа, а также эффективность в отношении влияния на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов. При этом наиболее выраженным иммуномодулирующим эффектом на состояние клеточного и гуморального иммунитета обладают арабино-3,6-галактан и 5-*O*-кофеилхинная кислота, а на фагоцитоз макрофагов - 20-гидроксизекдизон. Эти данные позволяют заключить, что реализация иммуномодулирующей активности экстракта *R. uniflorum* осуществляется за счет содержащихся в нем фенилпропаноидов, полисахаридов и экидистероидов.

Испытуемое растительное средство по выявленному иммунокорректирующему эффекту сопоставимо с действием референтного препарата из эхинацеи пурпурной. Экстракт *R. uniflorum* так же, как и экстракт *E. purpurea*, не оказы-

вает существенного влияния на показатели иммунного ответа у интактных мышей.

В основе иммуномодулирующего действия экстракта *R. uniflorum*, по-видимому, лежат его выраженные антиоксидантные свойства при циклофосфановой иммуносупрессии (снижение содержания МДА, повышение активности каталазы, СОД и глутатионпероксидазы), антирадикальная активность, а также способность стабилизировать мембраны иммунокомпетентных клеток.

Полученные данные указывают на перспективу использования экстракта *R. uniflorum* для разработки эффективных и безопасных иммунокорректирующих препаратов среди растительных видов сырья, содержащих, преимущественно, фенилпропаноиды, полисахариды и экидистероиды, с целью профилактики и лечения иммунодефицитных состояний.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт из надземной части *R. uniflorum* не оказывает существенного влияния на состояние гуморального звена иммунного ответа у интактных животных, а у мышей, подвергнутых циклофосфановой иммунодепрессии, стимулирует процессы антителообразования, увеличивая абсолютное и относительное число антителообразующих клеток.

2. Испытуемый экстракт значительно не влияет на состояние клеточного звена иммунного ответа у интактных мышей, а на фоне иммуносупрессии, вызванной циклофосфаном, повышает индексы клеточно-опосредованных иммунных реакций гиперчувствительности замедленного типа и трансплантат против хозяина.

3. Экстракт *R. uniflorum* при введении его интактным животным достоверно не изменяет состояние макрофагального иммунитета; у мышей с циклофосфановым иммунодефицитом стимулирует фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов в отношении частиц коллоидной туши, а также усиливает их антигенпрезентирующую функцию.

4. Экстракт *R. uniflorum* восстанавливает морфофункциональное состояние тимуса и селезенки, уменьшая выраженность в них деструктивных процессов, вызванных введением циклофосфана, способствуя усилению митотической активности и дифференцировки лимфоцитов.

5. Биологически активные вещества *R. uniflorum*: 5-*O*-кофеилхинная кислота, арабино-3,6-галактан и 20-гидроксиэкидизон обладают иммуномодулирующими свойствами в условиях моделирования иммунодефицита циклофосфаном; при этом наиболее выраженное действие в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа проявляют арабино-3,6-галактан и 5-*O*-кофеилхинная кислота, а в отношении фагоцитарной активности макрофагов - 20-гидроксиэкидизон.

6. Экстракт *R. uniflorum* обладает выраженными антиоксидантными свойствами при циклофосфановой иммуносупрессии, снижая выраженность процессов свободнорадикального окисления биомакромолекул (содержание МДА) и повышая активность ферментов антиоксидантной защиты организма (каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы), что может быть одним из механизмов его иммуномодулирующего действия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Tugarina, Yu.A. The influence of the dry extract from *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. on the state of the cellular immune response in experimental immunodeficiency / Yu.A. Tugarina, V.B. Khobrakova, R.V. Alekseev // Proceedings of the IX International Research to Practice Conference «Traditional Medicine: Ways of Consolidation with Modern Health Care». – Ulan-Ude, 2019. – P.122-123.
2. Хобракова, В.Б. Биомедицинские технологии использования фитопрепаратов при вторичных иммунодефицитах / В.Б. Хобракова, А.В. Халзанова, Ю.А. Тугарина, О.Л. Асалханова // Сб.тез. Междунар. научн. конф. «Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе». – Иркутск, 2019. – С.122-123.
3. Халзанова, А.В. Иммуномодулирующая активность экстрактов экидстероидсодержащих растений / А.В. Халзанова, Ю.А. Тугарина, В.Б. Хобракова // Сб. тез.докл. 5 Междисциплинарной конф. «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». – М., 2019. – С. 239-240.
4. Тугарина, Ю.А. Иммуномодулирующая активность экстрактов смолвки енисейской и левзеи одноцветковой при экспериментальном иммунодефиците / Ю.А. Тугарина, А.В. Халзанова, В.Б. Хобракова // Мат-лы IV Междунар. науч.-практич. конф. «Курортная база и природные лечебно-оздоровительные местности Тувы и сопредельных регионов». – Кызыл, 2019. – С. 88-91.
5. Тугарина, Ю.А. Экидстероидсодержащие растительные средства - перспективные иммуномодуляторы / Ю.А. Тугарина, А.В. Халзанова, А.Ц. Будацыренова // Материалы XIX межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня». – Чита, 2020. – С. 270-271.
6. Тугарина, Ю.А. Влияние экстракта сухого левзеи одноцветковой на состояние гуморального звена иммунитета при экспериментальной иммуносупрессии / Ю.А. Тугарина, В.Б. Хобракова, Р.В. Алексеев // Материалы II международной научно-практической конференции «Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений». – Севастополь, 2020. – С. 121-124.
7. Тугарина, Ю.А. Влияние индивидуальных веществ, выделенных из наземной части *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC., на состояние гуморального звена иммунитета при экспериментальной иммуносупрессии / Ю.А. Тугарина, В.Б. Хобракова, Л.Р. Абидуева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Растительные адаптогены в восстановительной медицине». – Улан-Удэ, 2021. – С.45-47.
8. Хобракова, В.Б. Перспективы использования растительных средств в качестве иммуномодуляторов / В.Б. Хобракова, А.В. Халзанова, Ю.А. Тугарина, А.Ц. Будацыренова, Л.Р. Абидуева // Научные труды Первого Национ. конгресса по фитотерапии и траволечению. – М., 2021. – С. 157-159.
9. Будацыренова, А.Ц. Коррекция иммунодефицитных состояний с использованием лекарственных средств из растений Байкальского / А.Ц. Будацыренова, Ю.А. Тугарина, А.В. Халзанова, В.Б. Хобракова, Л.Р. Абидуева // Материалы IV всероссийской конференции с международным участием, по-

священной Году науки и технологий в Российской Федерации и 40-летию Института общей и экспериментальной биологии СО РАН «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии». – Улан-Удэ, 2021. – С. 84-85.

10. Budatsyrenova, A.Ts. Prospects for the use of herbal remedies as immunomodulators / A.Ts. Budatsyrenova, A.V. Khalzanova, Yu.A. Tugarina, V.B. Khobrakova, L.R. Abidueva // *Mongolian Journal of Integrated Medicine*. – 2021. – Vol.9, № 3. – P.206.

11. Разуваева, Я.Г. Коррекция экстрактом *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. морфофункциональных изменений в тимусе и селезёнке мышей при циклофосфановой иммуносупрессии / Я.Г. Разуваева, В.Б. Хобракова, Ю.А. Тугарина, Д.Н. Оленников // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2022. – Т.7, № (5-2). – С. 114-121.

12. Хобракова, В.Б. Влияние экстракта сухого левзеи одноцветковой на состояние иммунной и антиоксидантной систем организма при экспериментальном иммунодефиците / В.Б. Хобракова, Ю.А. Тугарина, А.А. Торопова, Д.Н. Оленников, Л.Р. Абидуева // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2022. – Т. 25, № 1. – С. 43-49.

13. Khobrakova, V.B. Medicinal plants of the Baikal region as high-potential sources of immunomodulators / V.B. Khobrakova, D.A. Mandagaev, Sh-Zh.B. Zhamyanov, Yu.A. Tugarina, A.V. Khalzanova, A.Ts. Budatsyrenova, B.P. Shobolov, D.N. Olennikov // *Mongolian journal of integrated medicine*. – Ulaanbaator, 2023. – Vol. 13(1). – P. 53-54.

14. Хобракова, В.Б. Фармакотерапия иммунодефицитных состояний средствами из арсенала традиционной медицины / В.Б. Хобракова, А.В. Халзанова, Ю.А. Тугарина, А.Ц. Будацыренова, Ш-Ж.Б. Жамьянов, Д.А. Мандагаев // Сборник докладов I Всероссийского Конгресса «Современные технологии сохранения здоровья населения Российской Федерации». – М, 2024. – С.144-145.

15. Хобракова, В.Б. Иммуномодулирующая активность индивидуальных веществ, выделенных из надземной части *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC, при экспериментальном иммунодефиците / В.Б. Хобракова, Ю.А. Тугарина, Д.Н. Оленников, С.И. Павлова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2024. – Т. 27, №. 4. – С. 63-69.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОК – антителообразующая клетка; **АФК** – активные формы кислорода; **БАВ** – биологически активные вещества; **ГЗТ** – гиперчувствительность замедленного типа; **ГП** – глутатионпероксидаза; **ИР ГЗТ** – индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа; **МДА** – малоновый диальдегид; **ПМ** – перитонеальные макрофаги; **ПОЛ** – перекисное окисление липидов; **РТПХ** – реакция трансплантат против хозяина; **СОД** – супероксиддисмутаза; **ЭБ** – эритроциты барана; **ConA** – конканавалин А; **LPS** – липополисахарид.