На правах рукописи

БУДАЦЫРЕНОВА АЮНА ЦЫРЕНОВНА

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО *SERRATULA MARGINATA* TAUSCH НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Улан-Удэ – 2022

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 медицинского института, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» февраля 2023 г. в 12 ^{00} 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 Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: http://igeb.ru

Автореферат разослан «28» декабря 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент В.Б. Хобракова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в условиях загрязнения окружаюшей среды, физических воздействий (ионизирующего и СВЧ-излучения), длительного применения некоторых лекарственных препаратов (цитостатиков, антибиотиков, глюкокортикоидов и др.), хронического и эмоционального стресса происходит нарушение функционирования иммунной системы, что лежит в основе развития иммунодефицитных состояний, способствует развитию аутоиммунных заболеваний, аллергических, неинфекционных и инфекционно-воспалительных процессов, частому рецидивированию и атипичному течению заболеваний (Любошенко, 2014; Трошина, 2020; Арипова, 2021; Dhama, 2015; Stark, 2015). В связи с этим представляют большой интерес лекарственные средства, влияющие на основные звенья иммунитета и обладающие комплексным действием с учетом уровня и степени нарушений в иммунной системе (Лазарева, 2012; Лусс, 2018; Борщук, 2016; Самбукова, 2017; Хаитов, 2020). В настоящее время широко используются растительные средства и их извлечения, обладающие иммуномодулирующей активностью (Лазарева, 2005, 2012; Борсук, 2010; Гляделова, 2013; Walaa, 2012; Jantan, 2015). Кроме того, поиск новых отечественных лекарственных средств является одной из актуальных задач программы импортозамещения (Оборин, 2021; Атрощенко и др., 2022; Мельников, 2022; Соболева, Дехтярь, 2022). Активно ведутся исследования по применению иммуномодуляторов растительного происхождения для профилактики и лечения COVID-19 (Khanna, 2020; Sengupta, 2021; Simonova, 2021; Zhang, 2021; Fatimawali, 2022).

Степень разработанности темы исследования. На мировом фармацевтическом рынке представлены более 100 международных непатентованных наименований и около 400 торговых наименований иммуномодуляторов; насыщенность рынка препаратами этой группы продолжает расти (Исмаилов, 2017). Около 25% всех лекарственных средств на фармацевтическом рынке России составляют препараты растительного происхождения (Бойко, 2017). Иммуномодуляторы/иммуностимуляторы представлены 73 наименованиями (373 позиции), из них преобладают лекарственные средства растительного происхождения (47%). Источников иммунотропных лекарственных средств растительного происхождения, официально использующихся в практической медицине в нашей стране, немного (Вельмяйкина, 2012; Дутова, 2016). Наиболее известными являются лекарственные средства, полученные из растений рода *Echinacea* (Иммунал, Эхинацин, Эхинацея-галенофарм и др.) (Авдеева, Куркин, 2007; Дронов, 2011; Дутова, 2016). В связи с этим поиск новых лекарственных препаратов на основе растений, обладающих иммуномодулирующей активностью, является актуальной и перспективной задачей современной медицины.

Одним из таких представителей являются растения рода Серпуха – *Serratula*. Известно использование растений рода *Serratula* еще в древней китайской, монгольской и тибетской медицине; извлечения из растений применяются при неврозах и эпилепсии, как средства при воспалительных и инфекционных заболеваниях (диспепсия, фарингит, тонзиллит и др.) (Абышева, 2001; Воробьева, 2006). Экспериментальное исследование экстрактов из надземной части серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) показало их эф-

фективность в качестве противоязвенных средств, а также способность усиливать эффективность цитостатиков в терапии злокачественных опухолей (Ангаскиева, 2003). Установлено адаптогенное, ноотропное, антиоксидантное свойства экстракта сухого серпухи васильковой (*Serratula centauroides* L.) (Свиридов, 2016; Разуваева и др., 2021; Маркова и др., 2022; Shantanova et al., 2021). Уникальная биологическая активность растений рода *Serratula* определяется за счет комплекса веществ, входящих в их состав, среди которых идентифицированы: экдистероиды, полисахариды, тритерпеновые сапонины, флавоноиды, макро- и микроэлементы. Основными действующими веществами растений рода *Serratula* являются экдистероиды, обладающие значительной биологической активностью, в том числе, иммуномодулирующими свойствами (Мунхжаргал и др., 2007; Растительные ресурсы России…, 2013; Shakhmurova, 2018; Shantanova et al., 2021).

В Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН получен экстракт сухой из надземной части серпухи окаймленной (*Serratula marginata* Tausch). В литературе отсутствуют сведения о фармакологической активности *S. marginata*. Высокая эффективность извлечений, полученных из растений рода *Serratula*, аргументирует целесообразность исследований полученного экстракта *S. marginata* с последующей разработкой нового иммуномодулирующего средства.

Целью исследования явилось определение влияния экстракта сухого из надземной части *Serratula marginata* Tausch на состояние иммунной системы при экспериментальном иммунодефиците.

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

1) изучить влияние экстракта сухого *S. marginata* на гуморальное, клеточное звенья иммунного ответа и фагоцитоз макрофагов при введении его интактным животным;

2) определить иммуномодулирующую активность экстракта сухого *S.marginata* в отношении показателей основных звеньев иммунитета у животных с иммунодефицитом, индуцированном циклофосфамидом;

3) исследовать влияние индивидуальных веществ, выделенных из надземной части *S.marginata*, на состояние иммунной системы при циклофосфамид-индуцированной иммунодепрессии.

Научная новизна. Впервые установлена выраженная иммуномодулирующая активность экстракта сухого из надземной части *Serratula marginata* Tausch при циклофосфамид-индуцированной иммунодепрессии. Введение мышам внутрижелудочно экстракта сухого *S. marginata* в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг способствует нормализации нарушенных циклофосфамидом показателей иммунитета, что выражается в увеличении массы и числа ядросодержащих клеток тимуса и селезенки, индексов клеточно-опосредованных иммунных реакций гиперчувствительности замедленного типа и «трансплантат против хозяина», абсолютного числа антителообразующих клеток (АОК) и числа АОК на 10^6 спленоцитов, фагоцитарного индекса, а также активации антигенпрезентирующей функции перитонеальных макрофагов. Экстракт сухой *S.marginata* ограничивает деструктивные процессы в тимусе и селезенке, вызванные введением циклофосфамида, с восстановлением их структурных компонентов; повышает пролиферативную активность клеток лимфоидного ряда. При оценке влияния индивидуальных веществ,

выделенных из *S.marginata*, установлено, что наибольшее стимулирующее влияние на клеточный и гуморальный иммунитет оказывают лютеолин-7-*О*-глюкуронид и арабино-3,6-галактан, а на фагоцитоз макрофагов - 20-гидроксиэкдизон.

При введении экстракта сухого *S.marginata* интактным мышам показано, что испытуемое средство не оказывает достоверного влияния на состояние основных звеньев иммунитета, а также на пролиферативную активность Кон-А- и ЛПС-активированных лимфоцитов.

Одним из механизмов иммуномодулирующего действия экстракта сухого *S.marginata* является его способность снижать интенсивность свободнорадикальных процессов в гомогенате селезенки, вызванных циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессией, стабилизируя тем самым мембраны клеточных структур; повышать активность ферментов антиоксидантной защиты организма, а также проявлять радикал-связывающую активность в отношении реакционно-активных молекул.

Иммуномодулирующая активность экстракта сухого *S.marginata* сопоставима с действием референтного препарата – «Эхинацея».

Практическая значимость. Экспериментально обоснована возможность коррекции циклофосфамид-индуцированного иммунодефицита растительными средствами - экстрактом сухим из надземной части *S.marginata* и выделенными из нее индивидуальными соединениями, что дает основание считать целесообразными дальнейшие исследования по разработке новых потенциальных иммуномодулирующих препаратов.

Материалы исследований используются 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 сухой *S.marginata* при введении интактным мышам не оказывает как стимулирующего, так и ингибирующего действия на показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа;
- введение экстракта сухого *S.marginata* животным на фоне иммунодепрессии, индуцированной циклофосфамидом, приводит к ослаблению угнетающего действия цитостатика, восстанавливая массу и количество ядросодержащих клеток тимуса и селезенки, показатели иммунитета (абсолютное и относительное число АОК, индексы реакций гиперчувствительности замедленного типа и «трансплантат против хозяина», фагоцитарный индекс, выраженность антигенпрезентирующей функции макрофагов), а также структуру тимуса и селезенки;
- экстракт сухой *S.marginata* снижает интенсивность свободнорадикальных процессов в гомогенате селезенки, стабилизирует мембраны иммунокомпетентных клеток, повышает активность ферментов антиоксидантной защиты организма, а также проявляет радикал-связывающую активность в отношении реакционно-активных молекул;
- из индивидуальных веществ *S.marginata* лютеолин-7-*О*-глюкуронид и арабино-3,6-галактан обладают наиболее выраженным иммуномодулирующим действием, в большей степени восстанавливая показатели клеточного и

гуморального иммунитета; а 20-гидроксиэкдизон оказывает преимущественное влияние на функциональную активность макрофагов.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на: 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).

Связь задач исследований с проблемным планом НИР. Работа выполнена в Отделе биологически активных веществ 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 экдистероидсодержащих 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 8 научных работ, в том числе 2 - в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Структура и объем диссертации. Работа представлена на 130 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных экспериментальных исследований (3 главы), обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы, включающего 258 источников, 100 из них - на иностранных языках. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 8 рисунками, в том числе микрофотографиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили экстракт сухой из надземной части *Serratula marginata* Tausch и полученные из него индивидуальные соединения: флавоноид лютеолин-7-*O*-глюкуронид, полисахарид арабино-3,6-галактан и экдистероид 20-гидроксиэкдизон. Траву *S. marginata* собирали в окрестностях с. Мухоршибирь (Мухоршибирский район, Республика Бурятия), высушивали в конвекционной печи при 45°С до значения влажности не более 5%. Экстракт сухой *S. marginata* получен в лаборатории медико-биологических исследований Института общей и экспериментальной биоло-

гии СО РАН в результате последовательной экстракции измельченного сырья 60% этанолом и водой и концентрирования извлечения досуха (выход 23% от массы воздушно-сухого сырья). В результате анализа пяти партий экстракта в нем обнаружено присутствие следующих соединений (от массы сухого экстракта): экдистероиды – 20-гидроксиэкдизон 1.4–1.6%, полиподин В 0.2–0.3%, экдизон 0.01–0.02%, 2-дезокси-20-гидроксиэкдизон 0.01–0.02%; флавоноиды – лютеолин-7-*О*-глюкуронид 5.2–5.4%, апигенин-7-*О*-глюкуронид 0.2–0.3%, лютеолин 0.1–0.2%, апигенин 0.05–0.07%; гидроксициннаматы – 4-*О*-кофеилхинная кислота 0.4–0.6%, 5-*О*-кофеилхинная кислота 1.5–1.7%, 1,3-ди-*О*-кофеилхинная кислота 0.2–0.3%, кофейная кислота 0.05–0.07%; полисахариды 5.7–5.9%. Стандартизацию экстракта сухого осуществляли методом ВЭЖХ по содержанию 20-гидроксиэкдизона (не менее 1%). В результате хроматографического разделения экстракта *S.marginata* были выделены лютеолин-7-*О*-глюкуронид (чистота 94%), арабино-3,6-галактан (содержание углеводов 96%) и 20-гидроксиэкдизон (чистота 95%).

Исследования выполнены на 140 мышах линии CBA, 780 мышах-гибридах F1 (CBAxC57B1/6), 20 мышах Balb/C массой 20-22 г из питомника РАМН Столбовая, а также 190 белых крысах Wistar обоего пола с исходной массой 180-200 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (GLP) и приказом МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проводились в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Экспериментальная апробация и протокол исследования одобрен этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №3 от 04.11.2019 г.). Для эксперимента отбирали животных, которые соответствовали критериям включения в эксперимент, по принципу рандомизации они были разделены на группы по полу, возрасту, массе. 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 внутрибрюшинного введения в максимально переносимой дозе 250 мг/кг в объеме 1,0 мл/мышь (Масная и др., 2011).

Полученный экстракт сухой *S. marginata* вводили животным в виде водного раствора. По результатам экспериментальных исследований зависимости «доза-эффект» с использованием доз от 50 до 350 мг/кг была установлена экспериментально-терапевтическая доза 100 мг/кг при введении его *per os* мышам, а также условно-терапевтические дозы индивидуальных веществ, выделенных из *S. marginata,* исходя из процентного содержания их в экстракте*: лютеолин-7-О-глюкуронид* – 5 мг/кг (из расчета 5% в экстракте), арабино-3,6-галактан – 7 мг/кг (из расчета 7% в экстракте), 20-гидроксиэкдизон - 1 мг/кг (из расчета 1% в экстракте) путем внутрижелудочного введения зондом 1 раз в сутки на протяжении 14 дней. Для сравнения был выбран препарат «Эхинацея» - эхинацеи пурпурной травы экстракт (ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия). Дан-

ный препарат вводили животным перорально 1 раз в сутки в виде водного раствора в изоэффективной дозе 200 мг/кг в течение 14 дней. В интактную группу были включены мыши того же возраста, массы, пола, которые получали воду очищенную в соответствующем объеме по аналогичной схеме. Контрольная группа животных с иммунодефицитом получала эквивалентный объем воды очищенной по аналогичной схеме.

Изучение острой токсичности проводили по методу Кербера (Руководство…, 2012) путем однократного введения мышам экстракта внутрибрюшинно 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 мышей в отношении частиц коллоидной туши, путем определения оптической плотности лизата клеток перитонеального экссудата на спектрофотометре «CECIL-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 (КонА), В-клеток – липополисахарид (ЛПС). 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 циклофосфамид-индуцированного иммунодефицита оценивали путем определения в гомогенате селезенки белых крыс концентрации продукта ПОЛ - малонового диальдегида (МДА) (Камышников, 2017), активности супероксиддисмутазы (СОД) (Chevari, 1985), каталазы (Королюк, 1988) и содержания восстановленного глутатиона (ВГ) (Shaik, 2006). 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 ($ABTS^{\bullet+}$) (Tu, 2015); по степени связывания супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$) в неэнзиматической системе феназинметосульфат/НАДН (Rahini, 2014). Fe^{2+}- 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 эксперимен-

та. 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). Достоверность результатов исследования оценивалась по параметрическому критерию t-Стьюдента. При вероятности 95% ($P \leq 0,05$) различия между контрольными и опытными данными считались достоверными (Сергиенко, Бондарева, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке острой токсичности экстракта *S. marginata* установлено, что при его однократном внутрибрюшинном введении DL_{50} составила 982,36 мг/кг. При внутрижелудочном введении высоких доз экстракта выше 1750 мг/кг в течение всего времени наблюдения особенно остро проявлялись признаки общей интоксикации, в первые 2 суток животные были малоподвижны, шерсть становилась взъерошенной, отмечалось снижение потребления корма и учащение дыхания, однако, гибели животных в течение 14 суток не наблюдалось. Так, по классификации К.К. Сидорова (1973), экстракт *S. marginata* можно отнести к группе малотоксичных веществ.

Влияние экстракта *Serratula marginata* на состояние иммунной системы у интактных животных

При изучении влияния экстракта *S. marginata* в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг на состояние иммунной системы интактных мышей линий CBA и F1 (CBAxC57B1/6) было обнаружено, что данные средства не оказывали как стимулирующего, так и ингибирующего действия на массу и количество ЯСК тимуса и селезенки, абсолютное и относительное количество АОК, индекс реакции ГЗТ и фагоцитарный индекс.

При оценке влияния экстракта *S. marginata* в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов мышей линии Balb/c в МТТ-тесте установлено, что добавление изучаемого средства не приводило к значимому изменению пролиферации ЛПС-активированных и КонА-стимулированных спленоцитов ни в одной из изучаемых концентраций. Лишь в концентрации 100 мкг/мл под влиянием экстракта наблюдали незначительную тенденцию к снижению пролиферации ЛПС- и КонА-активированных

клеток на 9% и 14% соответственно, тогда как в концентрациях 1 и 10 мкг/мл показатели были сравнимы с данными в контрольной группе (Рисунок 1).

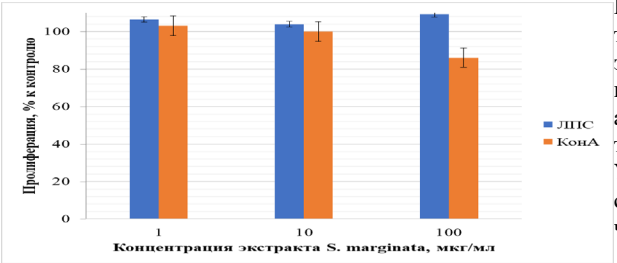


Рисунок 1 - Влияние экстракта *S. marginata* (24 ч экспозиции) на пролиферацию ЛПС- и КонА-активированных спленоцитов мышей Balb/C *in vitro.* Уровень 100% соответствует контрольному значению.

Таким образом, экстракт сухой *S. marginata* не оказывает иммунотоксического действия на функциональную активность основных звеньев иммунной системы организма, а также не влияет на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов.

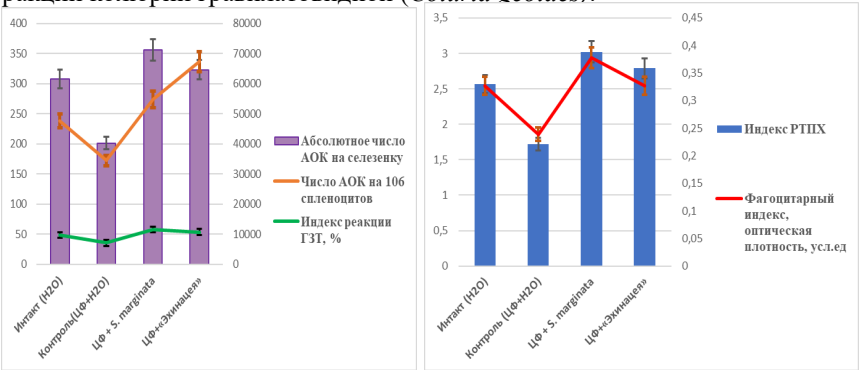
Иммунокорригирующая активность экстракта *Serratula marginata* при экспериментальной иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом

Как показали экспериментальные исследования, изучаемый экстракт *S.marginata* в дозе 100 мг/кг обладает иммуномодулирующим действием, которое проявлялось в достоверном увеличении массы и количества ЯСК тимуса и селезенки, показателей гуморального, клеточного и макрофагального звеньев иммунитета в условиях иммунодефицита, индуцированного циклофосфамидом.

Введение циклофосфамида мышам линии F1 (CBAxC57B1/6) в дозе 250 мг/кг приводило к достоверному снижению относительных масс тимуса и селезенки на 67% и 52% и уменьшению количества ЯСК тимуса и селезенки на 30% и 36%, соответственно, по сравнению с данными в интактной группе. Курсовое введение экстракта S.*marginata* в дозе 100 мг/кг показало достоверное увеличение относительной массы тимуса и селезенки в 1,8 и 1,9 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе. Под влиянием экстракта также наблюдалось увеличение ЯСК тимуса и селезенки в 1,3 и 1,8 раза, соответственно, по сравнению с результатами в группах животных, получавших только циклофосфамид.

При оценке влияния экстракта *S. marginata* на выработку антител в условиях иммуносупрессии циклофосфамидом установлено, что данное средство восстанавливает показатели гуморального иммунного ответа у мышей линии CBA. В контрольной группе животных, получавших циклофосфамид, абсолютное и относительное количество АОК уменьшилось на 32% и 23% соответственно по сравнению с данными в интактной группе. Введение экстракта *S. marginata* на фоне экспериментальной иммуносупрессии достоверно повышало 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 препарат «Эхинацея», абсолютное и относительное количество АОК увеличилось в 1,5 и 1,3 раза соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 2). Подобная активация про-

цесса антителообразования в условиях иммунодефицита, вызванного циклофосфамидом, отмечена в работе Л.П. Коваленко (2008) по оценке иммунокорригирующего действия растительного препарата Тонзилгон Н (состав: корни *Althaeae radix*, цветки *Chamomillae flores*, кора *Quercus cortex*, листья *Juglandis folia*, трава *Equiseti herba*, *Achillea millefotium* и *Taraxaci herba*), а также в исследовании С.В. Дутовой (2014) по влиянию водной и этанольной фракций колюрии гравилатовидной (*Coluria geoides*).



а) число АОК и индекс реакции ГЗТ б) индекс РТПХ и фагоцитарный индекс

Рисунок 2 - Влияние экстракта *Serratula marginata* на состояние основных звеньев иммунитета при иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом: а) число АОК и индекс реакции ГЗТ, б) индекс РТПХ и фагоцитарный индекс.
Здесь и далее: ЦФ – циклофосфамид.

Иммунодепрессивное действие циклофосфамида проявлялось угнетением клеточного звена иммунной системы у мышей линии F1 (CBAxC57B1/6), что выражалось в снижении индексов реакций ГЗТ и РТПХ на 27% и 33% соответственно по сравнению с результатами в интактной группе. Курсовое введение экстракта *S. marginata* мышам в состоянии иммунодефицита приводило к увеличению ИР ГЗТ и индекса РТПХ в 1,6 и 1,8 раза соответственно по сравнению с данными контрольной группы мышей. При введении мышам препарата сравнения «Эхинацея» наблюдалось увеличение данных показателей в 1,5 и 1,6 раза соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 2). Схожее восстановление реакции ГЗТ при циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии отмечено при введении животным водно-этанольного экстракта астрагала лисьего (*Astragalus vulpinus*) (Шур, 2018), препарата Тонзилгон Н (Коваленко, 2008), сухого и водного экстрактов листьев сладкого майорана (*Origanum majorana* L.) (Ramadan et al., 2012).

Изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (ПМ) мышей линии F1 (CBAxC57B1/6) по отношению к коллоидным частицам туши показало, что в контрольной группе, получавшей циклофосфамид, наблюдалось снижение фагоцитарного индекса (ФИ) на 27% по сравнению с результатами в интактной группе. Установлено, что после введения мышам на фоне циклофосфамида экстракта *S. marginata* отмечалось повышение ФИ в 1,6 раза по сравнению с данными в контрольной группе; в группе мышей, получавших препарат сравнения «Эхинацея», происходило увеличение

данного показателя в 1,4 раза по сравнению с контролем (Рисунок 2). Иммуномодулирующее действие в отношении макрофагального звена в условиях циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии показано при исследовании влияния экстрактов *Cichorium intybus* (L.) (Saybel et al., 2020), *Uncaria perrottetii* (Nudo, Catap, 2011), *Tinospora crispa* (Ahmad et al, 2018), а также комбинации из лекарственных растений *Phyllanthus emblica*, *Tinospora cordifolia* и *Piper nigrum* (Parveen et al., 2021).

При исследовании влияния экстракта *S. marginata* на антигенпрезентирующую функцию макрофагов в условиях циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии также установлено его стимулирующее действие. Трансплантация интактным мышам ПМ от иммунизированных эритроцитами барана мышей-доноров, получавших циклофосфамид, приводила к угнетению гуморального иммунитета, что выражалось в уменьшении абсолютного и относительного количества АОК в 1,6 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с данными в интактной группе. Введение иммунизированным мышам-донорам, подвергнутым воздействию циклофосфамида, экстракта *S. marginata* и трансплантация от них ПМ сингенным мышам-реципиентам способствовало повышению выраженности гуморального иммунного ответа, что выражалось в увеличении абсолютного и относительного числа АОК в 1,6 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с данными в контрольной группе. В группе мышей, получавших препарат «Эхинацея», отмечено увеличение данных показателей в 1,6 раза по сравнению с контролем. Подобное усиление антигенпрезентирующей функции макрофагов доказано в работе C. Wang et.al. (2017) при исследовании иммуномодулирующих свойств полисахарида, выделенного из *Epimedium koreanum* Nakai.

Аналогичные результаты по восстановлению нарушенных под влиянием цитостатиков показателей основных звеньев иммунитета (числа АОК, индекса реакции ГЗТ, ФИ) получены в работах И.В. Свиридова (2016) при исследовании иммуномодулирующих свойств экстракта серпухи васильковой (*Serratula centauroides* L.) и В.Б. Хобраковой и др. (2017, 2020, 2022) при оценке иммунокорригирующего действия экстрактов горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.), зопничка клубненосного (*Phlomoides tuberosa* (L.) Moench), смолевки енисейской (*Silene jeniseensis* Willd) и левзеи одноцветковой (*Rhaponticum uniflorum* (L.) DC.).

Патоморфологические исследования показали, что на фоне иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом, в тимусе мышей линии F1 (CBAxC57B1/6) развиваются структурные изменения в виде отека стромы, гемодинамических нарушений и выраженной инволюции лимфоидной ткани. Так, у животных контрольной группы на 14 сутки после введения цитостатика сохраняется акцидентальная инволюция тимуса, в частности, общая площадь дольки ниже на 39% таковой у животных интактной группы (Таблица 1). При этом отмечается снижение как абсолютной, так и относительной площади коркового вещества, а также увеличение данных показателей для мозговой области относительно данных в интактной группе, в результате этого корково-мозговой индекс на 24% ниже такового у интактных животных. Паренхима коркового вещества выглядит более светлой, вследствие снижения плотности тимоцитов как в субкапсулярной зоне (на 21 %), так и в глубоких слоях коры

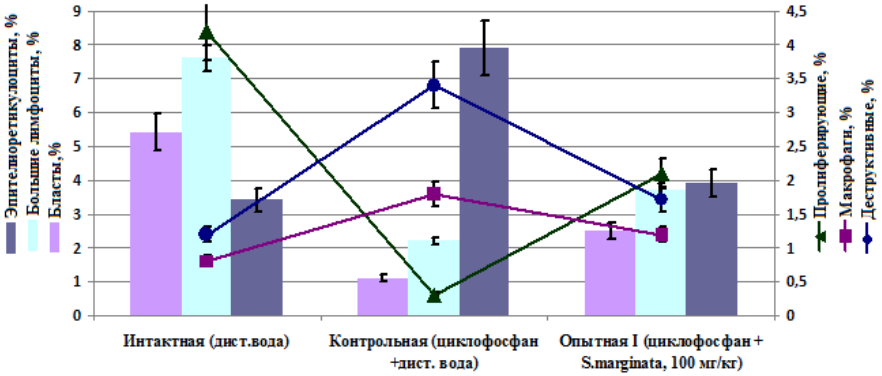
(на 29%) по сравнению с данными в группе интактных животных. Также в корковом веществе визуализируются значительные области опустошения. Снижение плотности клеток в корковом веществе обусловлено ингибированием пролиферативной активности тимоцитов, а также усилением в них деструктивных процессов, приводящих к их гибели.

Таблица 1 - Влияние экстракта сухого *Serratula marginata* на морфометрические показатели тимуса мышей при иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом

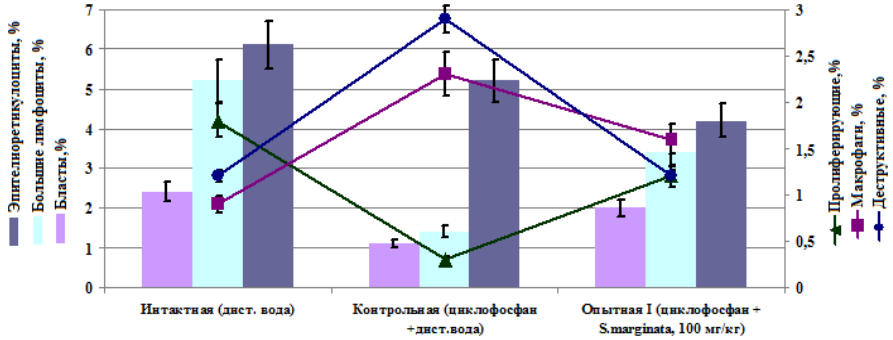
Показатели	Интактная (H_2O), n=10	Контрольная (Циклофосфамид + H_2O), n=10	Опытная (Циклофосфамид + *S. marginata*), n=10
S дольки, мм^2	18,9±2,83	11,5±0,94*	14,7±1,02**
S коркового вещества, мм^2	11,9±1,04	7,5±0,54*	10,5±0,72**
S мозгового вещества, мм^2	5,5±0,76	4,0 ±0,53	4,3±0,45
S коркового вещества, %	71,0±2,30	68,5±1,40	69,4±1,85
S мозгового вещества, %	28,9±2,24	31,5±1,40	30,6±1,85
Корково-мозговой индекс	2,6±0,21	1,9±0,22	2,4±0,21
Плотность тимоцитов в субкапсулярной зоне, n/ 15000мкн^2	372,8±16,57	295,1±21,03	332,5±11,7
Плотность тимоцитов в глубоких слоя коркового вещества, 15000мкн^2	428,6±28,34	304,3±8,52	375,3±15,21**

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

Цитологическое исследование клеточного состава субкапсулярной области и глубоких слоев кортикальной зоны показало, что на фоне введения цитостатика снижается количество бластов (на 80 и 54 %), больших лимфоцитов (в среднем на 72 %) и клеток, находящихся на стадии митоза (в 6,0 и 2,3 раза соответственно), относительно таковых у животных интактной группы. Количество деструктивных клеток в контроле составляет 2,9-3,4%, против 0,5-0,8% в интакте; число макрофагов повышается в 2,3-2,8 раза по сравнению с данными в интактной группе. Введение цитостатика оказывает влияние на клетки стромы; так, в корковой области отмечается увеличение эпителиоретикулоцитов, при этом в глубоких слоях на 27%, а в субкапсулярной области – в 2,3 раза, что, вероятно, обусловлено снижением плотности тимоцитов (Рисунок 3).



а) Субкапсулярная зона



б) Средние слои

Рисунок 3 - Влияние экстракта сухого *Serratula marginata* на клеточный состав коркового вещества тимуса мышей при иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом: а) – субкапсулярная зона; б) – средние слои

Мозговое вещество тимуса у животных контрольной группы имело более интенсивную окраску, чем у интактных животных, за счет увеличения плотности клеток. Граница между корковым и мозговым слоями нечеткая, что характеризуется как «инверсия слоев» (Рисунок 4). Уменьшение количества эпителиальных телец в мозговом веществе также свидетельствовало о снижении функциональной активности органа.

Курсовое введение животным экстракта *S. marginata* способствует ограничению структурных изменений в тимусе и более быстрому восстановлению органа после акцидентальной инволюции. На 16 сутки опыта у животных опытной группы наблюдается умеренный отек стромы и капсулы; нарушения со стороны микроциркуляции не выявляются. На фоне введения исследуемого средства площадь коркового вещества повышается на 39%, площадь мозгового вещества снижается на 8%, в результате чего корково-медуллярный индекс увеличивается на 26% и общая площадь тимуса – на 28% по сравнению с показателями контрольных животных. Анализ клеточного состава коркового

вещества показал, что у животных, получавших экстракт *S. marginata,* в субкапсулярной зоне и средних слоях коркового вещества увеличивается количество митотически делящихся клеток (в 7,0 и 4.0 раза), бластов (в 2,3 и 1,8 раза) и больших лимфоцитов (в 1,7 и 2,4 раза), а также уменьшается число клеток со структурными нарушениями (в 2,0 и 1,6 раза) и макрофагов (на 33 и 30% соответственно) по сравнению с показателями животных контрольной группы (Рисунок 3). Ограничение деструктивно-дистрофических изменений в цитоплазме тимоцитов, и как следствие некроза клеток, а также усиление их пролиферативной активности способствуют повышению плотности лимфоцитов в корковом веществе на 13-23% по сравнению с показателем контрольных животных. Между корковой и мозговой зонами присутствует цветовой контраст, корково-мозговая граница четко дифференцируется (Рисунок 5). В мозговом слое увеличивается число эпителиоретикулярных телец.

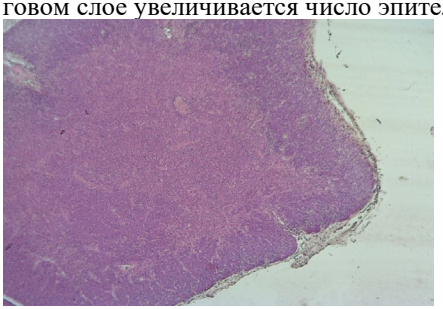


Рисунок 4 - Тимус мыши на фоне введения циклофосфамида. Наблюдается разволокнение капсулы органа, кровенаполнение сосудов. Кортико-медуллярная граница выглядит «размытой», отмечается «инверсия слоев». Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10, об. 5.

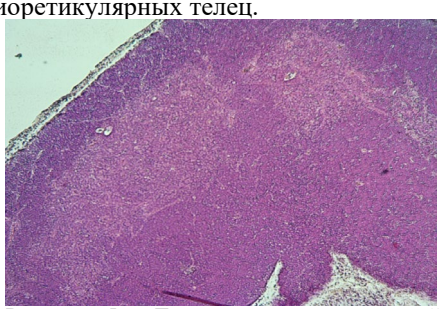


Рисунок 5 - Тимус мыши, получавшей экстракт сухой *S. marginata*, на фоне введения циклофосфамида. Четкое разграничение коркового и мозгового слоев. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10, об. 5

Результаты морфометрических исследований показали, что у животных интактной группы белая пульпа составляет 29,4±2,96% от общей площади органа (Рисунок 6). Лимфоидные фолликулы в большинстве случаев имеют эллипсоидную форму и в них наблюдается четкое разграничение Т- и В-зон. Вокруг центральной артерии формируется периартериальная муфта, на периферии которой располагается герминативный центр, окруженные интенсивно окрашенной мантией и далее маргинальной зоной.

Введение циклофосфамида способствует развитию морфофункциональных изменений в паренхиме селезенки, которые были более выражены в белой пульпе. В красной пульпе наблюдаются гемодинамические нарушения и выраженная макрофагальная реакция. В белой пульпе помимо нарушений со стороны микроциркуляторного русла отмечаются выраженные инволютивные изменения, характеризующиеся снижением плотности клеток и уменьшением ее объема относительно общего объема органа (Рисунок 7). Так, у животных контрольной группы относительный объем белой пульпы составил 17,6±1,38%, что ниже в 1,7 раза показателя у интактных животных (Рисунок 6). Лимфоидные фолликулы имеют в большинстве случаев неправильную

форму, более светлую окраску, из-за опустошения мантийной зоны и периартериальной лимфоидной муфты. Вторичные фолликулы не отмечаются ни у одного животного контрольной группы (Рисунок 7).

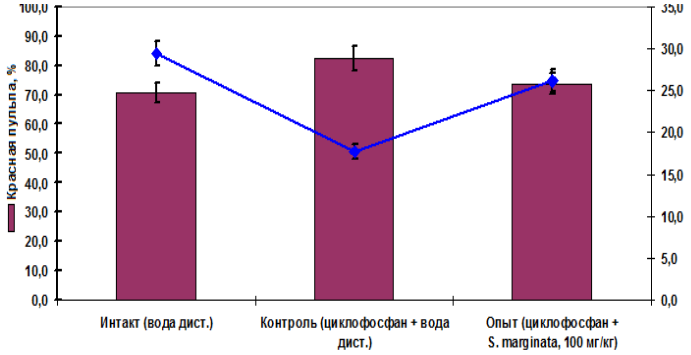


Рисунок 6 - Влияние экстракта сухого *Serratula marginata* на морфометрические показатели селезенки мышей при иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом

Наши результаты согласуются с данными других авторов, показавших, что циклофосфамид в исследованиях *in vitro* и *in vivo* проявляет цитотоксическое действие в отношении лимфоцитов селезенки, тем самым способствует инволюции белой пульпы (Кащенко, Золотаревская, 2011; Бобрышева, 2015; Горичный, Чалисова, 2020).

Введение животным экстракта сухого *S. marginata* ограничивает развитие иволютивных изменений в селезенке, развивающихся на фоне циклофосфамида. Так, у животных опытных групп площадь белой пульпы выше на 47% по сравнению с таковой в контроле (Рисунок 6). В лимфоидных узелках отмечаются герминативные центры; периартериальная лимфоидная муфта и мантийная зона становятся более интенсивно окрашенными, вследствие пролиферации и дифференцировки лимфоцитов (Рисунок 8).

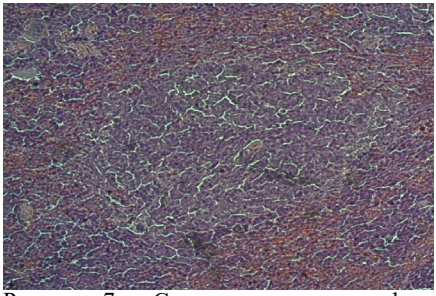


Рисунок 7 - Селезенка мыши на фоне введения циклофосфамида. Фолликул не имеет центр размножения. Кровенаполнение сосудов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10, об. 20.

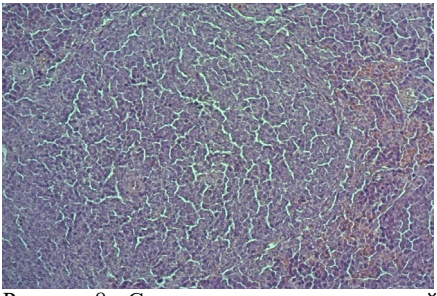


Рисунок 8 - Селезенка мыши, получавшей экстракт сухой *Serratula marginata*, на фоне введения циклофосфамида. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10, об. 20.

Аналогичные результаты по восстановлению структуры иммунных органов под влиянием растительных средств отмечены в работе Е.А. Лебединской

и др. (2014), в которой установлено, что сульфатированный полисахарид фукоидан из бурой водоросли *Laminaria japonica* способствует пролиферации лимфоидных клеток в первичных и вторичных органах иммуногенеза. В исследованиях Д.З. Цыреновой и др. (2017) показано, что курсовое применение экстракта *Phlomoides tuberosa* L. Moench при экспериментальном иммунодефиците, индуцированном азатиоприном, приводит к нивелированию супрессивного действия цитостатика: увеличению площади белой пульпы и толщины периартериальной лимфоидной муфты селезенки мышей, а также увеличению диаметра лимфоидных узелков и количества герминативных центров. Доказано иммуномодулирующее действие экстракта *Gentiana algida* Pall при иммунодефиците, вызванном введением азатиоприна, за счет ограничения развития выраженных инволютивных процессов в вилочковой железе, повышения митотической активности тимоцитов, снижения степени выраженности деструктивных процессов и предотвращения разрастания жировой ткани (Хобракова и др., 2020). При оценке влияния отвара астрагала перепончатого на структуру тимуса и селезенки при иммунодефиците отмечено увеличение толщины коркового вещества дольки тимуса, восстановление в селезенке структуры лимфоидных фолликулов (Батоева и др., 2019).

Влияние экстракта *Serratula marginata* на состояние эндогенной антиоксидантной системы и процессы перекисного окисления липидов при циклофосфамид-индуцированном иммунодефиците

Поскольку оксидативный стресс является одним из важнейших патогенетических механизмов повреждения мембран иммунокомпетентных клеток, представляло интерес исследовать влияние экстракта сухого *S.marginata* на состояние эндогенной антиоксидантной системы и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) при циклофосфамид-индуцированном иммунодефиците.

В ходе эксперимента установлено, что введение циклофосфамида вызывает выраженную индукцию ПОЛ, о чем свидетельствует увеличение содержания МДА в гомогенате селезенки в 2,1 раза по сравнению с данными в интактной группе Введение животным опытной группы экстракта *S. marginata* на фоне иммуносупрессии значительно уменьшало выраженность окислительного стресса и способствовало корригированию дисбаланса между про- и антиоксидантной системами организма. Так, содержание МДА в гомогенате селезенки крыс, получавших исследуемый экстракт, снижалось в 1,7 раза (Таблица 2).

Одним из факторов усиления процессов ПОЛ является угнетение активности эндогенной антиоксидантной системы (АОС) организма. Так, в контрольной группе животных отмечалось снижение активности СОД и каталазы, а также содержания ВГ в 2,3; 2,5 и 2,0 раза соответственно по сравнению с интактом. В группе крыс, получавших исследуемый экстракт, активность СОД, каталазы и содержание ВГ увеличилось в 1,8; 1,9 и 1,5 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе животных. Выявленные изменения в функционировании эндогенной антиокислительной системы указывают на наличие антиоксидантных свойств экстракта *S. marginata* при экспериментальном иммунодефиците, что является одним из

важных аспектов иммунопротекторного действия исследуемого фитосредства (Таблица 2).

С целью определения молекулярных и клеточных механизмов иммуномодулирующего действия экстракта *S. marginata* была проведена оценка его антирадикальной активности и мембраностабилизирующих свойств в модельных системах *in vitro*. Так, при внесении в инкубационную среду исследуемого экстракта в его конечных концентрациях: 85,14; 9,50; 0,90; 0,06 и 0,0025 мкг/мл отмечалось снижение интенсивности перекисного гемолиза эритроцитов. Концентрация экстракта *S. marginata*, снижающая интенсивность гемолиза на 50%, составила 0,045 мкг/мл.

Таблица 2 – Влияние экстракта сухого *Serratula marginata* на состояние антиоксидантной системы при экспериментальной иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом

Группы животных	МДА, мкмоль/ г ткани	СОД, мкмоль/мин/ мг белка	Каталаза, ммоль/мин/ г ткани	ВГ, мкмоль/ г ткани
Интактная (H2O), n=10	57,4±4,12	51,1±3,21	35,2±2,11	325,1±10,22
Контрольная (цилофосфамид+H2O), n=10	120,4±7,20*	22,2±1,14*	14,1±0,53*	163,2±10,11*
Опытная (циклофосфамид +экстракт S. marginata), n=10	70,3±6,71**	39,1±0,33**	26,6±1,14**	252,1±12,14**

Согласно данным, приведенным в таблице 3, экстракт *S. marginata* проявляет выраженную антирадикальную активность в отношении стабильного хромоген-радикала DPPH (IC_{50} = 52,3 мкг/мл), а также катион-радикала ABTS (IC_{50} = 57,1 мкг/мл). При определении способности испытуемого фитосредства связывать супероксидный анион-радикал и ионы металла переменной валентности (Fe^{2+}) установлено наличие активности экстракта *S. marginata* в отношении указанных частиц. В эксперименте показано, что исследуемый экстракт обладает Fe^{2+}-хелатирующим действием (IC_{50} = 267,4 мкг/мл), близким к активности вещества-сравнения - аскорбиновой кислоты (IC_{50} = 173,1 мкг/мл). Fe^{2+}-связывающая активность *S. marginata* обусловлена содержанием в его составе высокомолекулярных углеводов и флавоноидов, что объясняет способность экстракта ингибировать катализируемое железом образование гидроксильного радикала. Выявленная Fe^{2+}- связывающая активность согласуется с изученной выше мембраностабилизирующей активностью фитосредства в условиях реакции Фентона. Экстракт *S. marginata* проявляет активность в отношении связывания $O^{2\bullet-}$ радикала (IC_{50} = 67,2 мкг/мл), превосходящую таковую аскорбиновой кислоты, а также оказывает протективное действие по отношению к полипептидам, предупреждая их окисление в модели с желточными липопротеидами (Fe (II)/$OH^{\bullet}$) (IC_{50}=620,2 мкг/мл) (Таблица 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что экстракт *S. marginata* оказывает антиоксидантное действие, выражающееся в сохранении каталитической активности ферментов и повышении содержания пептидов эндогенной антиоксидантной системы организма. Отмечено, что под влиянием экстракта

снижается образование продуктов перекисного окисления липидов - МДА на фоне экспериментальной иммуносупрессии циклофосфамидом. В модельных системах экстракт *S. marginata* проявляет выраженное мембраностабилизирующее действие, стабилизируя структурно-функциональную целостность плазматической мембраны эритроцитов в условиях гемолиза, а также радикал-связывающую активность в отношении реакционно-активных молекул (DPPH, ABTS, Fe^{2+}, $O_2^{\bullet-}$).

Таблица 3 – Антирадикальная активность экстракта сухого *Serratula marginata* в модельных системах *in vitro*, IC_{50} мкг/мл

Объект	Реакционно-активные молекулы				
	$DPPH^{\cdot}$	$ABTS^{\bullet+}$	$O^{2\bullet-}$	Fe (II)	Fe (II)/$OH^{\bullet}$
S.marginata	52,3±3,12	57,1±4,10	67,2±4,41	267,4±7,33	620,2±10,51
АК[a]	7,5±0,53	41,2±1,23	83,5±5,12	173,1±6,11	256,0±9,42
Тролокс[a]	3,2±0,20	27,1±1,54	-	-	

Примечание. [a] – вещество сравнения; АК – аскорбиновая кислота

Выявленное антиоксидантное действие испытуемого экстракта определяется наличием в его составе биологически активных веществ, в частности, флавоноидов, экдистероидов и полисахаридов, способных стабилизировать и инактивировать реакционно-активные молекулы, ингибировать процессы ПОЛ, повышать активность ферментов антиоксидантной защиты организма, стабилизируя тем самым мембраны клеточных структур (Ендонова и др., 2018; Bathori et al., 2004; Kayani et al., 2016; Panche et al., 2016; Das et al., 2020; Arif et al., 2022).

Наши данные по оценке антиоксидантной и антирадикальной активности испытуемого экстракта согласуются с результатами работ, в которых отмечено снижение уровня МДА, увеличение активности каталазы, СОД, повышение содержания ВГ, высокая способность к хелатированию ионов Fe^{2+}, инактивация реакционно-активных молекул под влиянием экстрактов сухих, полученных из надземной части *Silene jeniseensis* (Халзанова и др., 2021) и *Rhaponticum uniflorum* (Хобракова и др., 2022), сухого и водного экстрактов листьев сладкого майорана (*Origanum majorana* L.) (Ramadan et al., 2012), настойки *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim (Торопова и др., 2013) и растительного средства «Литофит», содержащего флавоноиды (авикулярин, рутин, гиперозид, гликозиды кемпферола, рамнетина, лютеолина), полисахариды, аскорбиновую кислоту, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества (Батуева и др., 2015).

Иммуномодулирующие свойства индивидуальных соединений, выделенных из *Serratula marginata*, при иммунодепрессии, индуцированной циклофосфамидом

При изучении влияния индивидуальных соединений из *S. marginata* на гуморальное звено иммунной системы установлено, что данные вещества восстанавливают процессы антителообразования в модели циклофосфамид-

индуцированной иммуносупрессии. Введение циклофосфамида мышам линии F1 (CBAxC57B1/6) приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и числа АОК на 10^6 спленоцитов на 35% и 28%, соответственно, по сравнению с теми же показателями в интактной группе. При введении 20-гидроксиэкдизона, лютеолина-7-*O*-глюкуронида и арабино-3,6-галактана из надземной части *S.marginata* на фоне иммуносупрессии отмечали достоверное увеличение количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10^6 спленоцитов. В опытной группе 1, получавшей лютеолин-7-*O*-глюкуронид, первый показатель превышал уровень супрессии в 1,9 раза, второй – в 1,8 раза; в опытной группе 2, получавшей арабино-3,6-галактан, первый показатель превышал контрольные значения в 1,9 раза, второй – в 1,7 раза; в опытной группе 3, получавшей 20-гидроксиэкдизон, первый показатель превышал уровень супрессии в 1,5 раза, второй – в 1,4 раза (Рисунок 9).

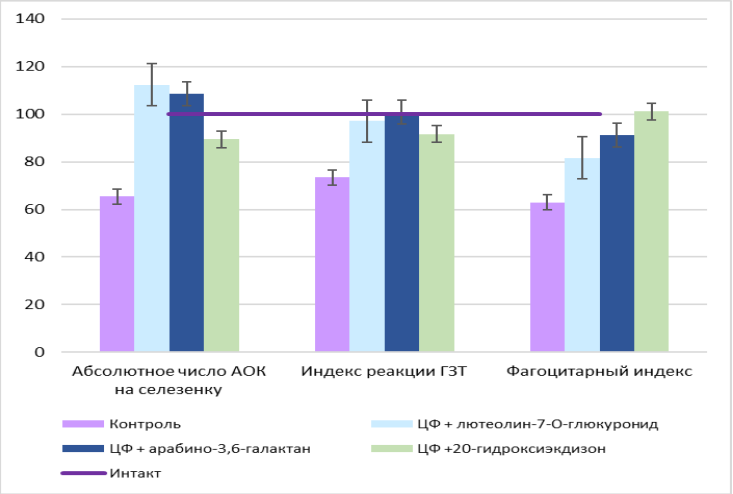


Рисунок 9 - Влияние 20-гидроксиэкдизона, лютеолина-7-*O*-глюкуронида и арабино-3,6-галактана, выделенных из *S.marginata,* на состояние иммунной системы организма при иммуносупрессии, индуцированной циклофосфамидом (% стимуляции относительно интактной группы животных – 100%)

При исследовании влияния индивидуальных веществ на клеточное звено иммунной системы было установлено, что исследуемые вещества восстанавливают индекс клеточно-опосредованной реакции ГЗТ в условиях циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии. Введение циклофосфамида приводило к снижению индекса реакции ГЗТ на 26 % по сравнению с тем же показателем в интактной группе. После введения животным опытной группы, подвергшимся иммунодепрессии, 20-гидроксиэкдизона, лютеолина-7-*O*-глюкуронида и арабино-3,6-галактана отмечалось увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,2, 1,4, 1,5 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе животных соответственно (Рисунок 9).

При оценке влияния индивидуальных веществ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов в отношении частиц коллоидной туши бы-

ло установлено, что наибольшее стимулирующее влияние на данное звено оказывает экдистероид 20-гидроксиэкдизон, увеличивая фагоцитарный индекс в 1,6 раза по сравнению с группой мышей, получавших циклофосфамид; в группе мышей, получавших арабино-3,6-галактан, наблюдалось увеличение индекса в 1,4 раза, и наименьшее стимулирующее влияние отмечалось в группе животных, получавших флавоноид лютеолин-7-*О*-глюкуронид (увеличение в 1,3 раза) (Рисунок 9).

Схожие результаты получены при оценке влияния экдистероидов *Silene viridiflora, Silene brahuica и Ajuga turkestanica* на гуморальный иммунитет (Бобаев и др., 2012; Шахмурова и др., 2013); экдизона (Figueiredo et al., 2006) и экдистероидов *Serratula coronata* (L.) (Репина, 2007; Пунегова, 2009) – на фагоцитарную активность макрофагов. Экдистероиды проявляют иммуномодулирующее действие за счет подавления активации сигнальных путей MAPKs, Akt (Arif, 2022) и наличия выраженных адаптогенных свойств (Свиридов, 2016; Bajguz, 2015; Das et al., 2020; Shantanova et al., 2021).

Полученные нами данные по восстановлению показателей основных звеньев иммунитета в условиях экспериментального иммунодефицита под влиянием флавоноида лютеолин-7-*О*-глюкуронида согласуются с результатами исследований A. Ganeshpurkar, A.K. Saluja (2017, 2018), показавших стимулирующее влияние флавоноидов рутина и катехина на клеточный иммунитет и фагоцитоз макрофагов; В.Б. Хобраковой, Д.Н. Оленникова (2012), установивших, что флаваноны софоры желтоватой (*Sophora flavescens* Ait) (кураринон и софорафлаванон G) увеличивают число АОК и индекс реакции ГЗТ; В.Б. Хобраковой, Д.З. Цыреновой (2017), доказавших иммуномодулирующее действие фенилпропаноида (форситозида B), выделенного из клубней зопника клубненосного (*Phlomoides tuberosa* (L.) Moench), в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа; Е.Б. Хлебцовой и др. (2014), описавших стимуляцию индекса реакции ГЗТ флавоноидами, входящими в состав лофанта анисового (*Lophanthus anisatus* Nutt.); H.I. Abd-Alla et al. (2009), установивших иммуномодулирующее действие в отношении как гуморального, так и клеточно-опосредованного иммунного ответа у флавоноидов из листьев *Jatropha curcas* L. (апигенин 7-O-β-D-неогесперидозид, апигенин 7-*О*-β-D-галактозид, ориентин, витексин, виценин и апигенин); O. Saybel et al. (2020), показавших стимулирующее влияние на клеточный, гуморальный и макрофагальный иммунитет фенольных соединений из цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) при циклофосфановой иммуносупрессии. Известно, что флавоноиды подавляют сигнальный путь PI3k/AKT/mTOR в Th-клетках (Aysooda, 2019) и оказывают свое влияние на баланс между выработкой про- и противовоспалительных цитокинов (Comalada, 2006; Crouvezier, 2011; Yahfoufi, 2018).

Наши данные по нормализации параметров иммунитета при иммуносупрессии под влиянием полисахарида арабино-3,6-галактана соотносятся с работами А.А. Фоминой и др. (2014) по оценке иммуномодулирующих свойств полисахаридов травы рдеста пронзеннолистного (*Potamogeton perfoliatus* L.) за счет стимуляции фагоцитоза, активности миелопероксидазы в макрофагах, цитокининдуцирующей активности моноцитов в условиях циклофосфановой иммуносупрессии; Е.Н. Медведевой и др. (2004) по стимулирующему влиянию арабиногалактана лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на про-

цессы антителообразования в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Стимулирующее влияние на фагоцитарную активность макрофагов установлено у полисахаридов, выделенных из *Fresh Garlic and Black Garlic* (Li et al., 2017), *Dendrobium sonia* (Liu et al., 2019), *Celosia cristata* (Sun et al., 2015), *Erythronium sibiricum* (Kasimu et al., 2017), *Polygonatum sibiricum* (Chen et al.,2020), *Menispermum dauricum* (Yang et al., 2022). Механизм действия полисахаридов связан с активацией посредством TOLL-подобных рецепторов транскрипционного ядерного фактора (NF-kB), являющегося центральным звеном иммунных реакций, с последующей секрецией макрофагами АФК, NO и цитокинов (TNF- α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ) (Kouakou et.al., 2013; Luo et.al., 2018; Shin et.al., 2018; Yin et.al., 2019; Cao, 2022).

Исходя из полученных нами данных, индивидуальные вещества, выделенные из *S.marginata,* оказывают положительное влияние не только на гуморальные и клеточные иммунные реакции, но и на факторы неспецифической резистентности организма, играющие значительную роль на этапах специфического иммунного ответа; наибольшее стимулирующее влияние на клеточный и гуморальный иммунитет оказывают флавоноид лютеолин-7-*О*-глюкуронид и полисахарид арабино-3,6-галактан, а на фагоцитоз макрофагов – экдистероид 20-гидроксиэкдизон.

Таким образом, нормализующее влияние испытуемого средства на состояние иммунной системы организма при иммуносупрессии обеспечивается благодаря содержанию в нем ряда биологически активных веществ, преимущественно, флавоноидов, полисахаридов и экдистероидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о выраженной иммуномодулирующей активности экстракта сухого из надземной части *S.marginata* и ее индивидуальных соединений при вторичном иммунодефиците, индуцированном циклофосфамидом. Введение мышам *per os* экстракта *S.marginata* в экспериментально-терапевтической дозе 100 мг/кг на фоне иммунодепрессии приводило к значимому увеличению показателей клеточно-опосредованных иммунных реакций ГЗТ и РТПХ, антителообразования и функциональной активности макрофагов до уровня, наблюдаемого у интактных мышей. Введение опытным животным экстракта *S.marginata* на фоне циклофосфамида восстанавливает морфофункциональное состояние иммунных органов, что проявляется в ограничении инволютивных процессов в тимусе и селезенке, увеличении объемной доли лимфоидной ткани за счет активации пролиферативной активности лимфоцитов. Использование индивидуальных веществ (лютеолина-7-*О*-глюкуронида, арабино-3,6-галактана и 20-гидроксиэкдизона), выделенных из надземной части *S.marginata,* приводило к восстановлению нарушенных циклофосфамидом параметров иммунитета. При этом наиболее выраженным иммуномодулирующим эффектом из индивидуальных соединений обладают лютеолин-7-*О*-глюкуронид и арабино-3,6-галактан. Иммунокорригирующая активность испытуемого экстракта сопоставима с действием референтного препарата – «Эхинацея»; кроме того, оба средства не оказывают как стимулирующего, так и ингибирующего действия на показатели иммунитета у интактных животных.

Иммуномодулирующая активность экстракта сухого *S.marginata* обусловлена его выраженными антиоксидантными свойствами при циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии, антирадикальной активностью, а также способностью стабилизировать мембраны иммунокомпетентных клеток.

Наличие выраженной иммуномодулирующей активности у экстракта сухого *S.marginata* позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения с целью создания лекарственных средств для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт *S. marginata* при введении интактным животным не оказывает как стимулирующего, так и ингибирующего действия на показатели реакций клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунитета, а также пролиферацию Кон-А- и ЛПС-активированных лимфоцитов, что позволяет отнести его к группе иммуномодуляторов, проявляющих свое действие при нарушениях функций иммунной системы организма.

2. Экстракт *S. marginata* обладает выраженной иммуномодулирующей активностью при циклофосфамид-индуцированном иммунодефиците, восстанавливая массу и количество ядросодержащих клеток тимуса и селезенки, показатели иммунного ответа в реакциях антителообразования, клеточно-опосредованного иммунитета (гиперчувствительности замедленного типа и трансплантат против хозяина), фагоцитоза перитонеальных макрофагов; стимулируя антигенпрезентирующую функцию макрофагов; нормализуя морфофункциональное состояние тимуса и селезенки с восстановлением их структурных компонентов и активацией пролиферативной активности клеток лимфоидного ряда.

3. Одним из основных механизмов иммуномодулирующего влияния экстракта сухого *S.marginata* является его способность снижать интенсивность свободнорадикальных процессов в гомогенате селезенки, вызванных циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессией, стабилизируя тем самым мембраны клеточных структур; повышать активность ферментов антиоксидантной защиты организма, а также проявлять радикал-связывающую активность в отношении реакционно-активных молекул.

4. Из индивидуальных веществ, выделенных из *S. marginata,* наибольшее стимулирующее влияние на клеточный и гуморальный иммунитет оказывают лютеолин-7-*O*-глюкуронид и арабино-3,6-галактан, а на фагоцитоз макрофагов - 20-гидроксиэкдизон.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Тугарина, Ю.А. Экдистероидсодержащие 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.

2. Будацыренова, А.Ц. Влияние экстракта сухого серпухи окаймленной на состояние клеточного звена иммунитета при экспериментальном иммуно-

дефиците / А.Ц. Будацыренова, В.Б. Хобракова, С.Б. Гармаев // Материалы II международной научно-практической конференции «Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений». - Севастополь, 2020. - С. 17-19.
3. 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 Национального конгресса по фитотерапии и траволечению. – М., 2021. – С. 157-159.
4. Будацыренова, А.Ц. Иммуномодулирующие свойства 20-гидроксиэкдизона, выделенного из надземной части *Serratula marginata* Tausch, при циклофосфановом иммунодефиците / А.Ц. Будацыренова, В.Б. Хобракова, Л.Р. Абидуева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Растительные адаптогены в восстановительной медицине». – Улан-Удэ, 2021. – С. 33-35.
5. 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.
6. Будацыренова, А.Ц. Коррекция иммунодефицитных состояний с использованием лекарственных средств из растений Байкальского региона / А.Ц. Будацыренова, Ю.А. Тугарина, А.В. Халзанова, В.Б. Хобракова, Л.Р. Абидуева // Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии». - Улан-Удэ, 2021. - С. 84-85.
7. Хобракова, В.Б. Иммуномодулирующая активность экстракта сухого *Serratula marginata* Tausch при экспериментальном иммунодефиците / В.Б. Хобракова, А.Ц. Будацыренова, Д.Н. Оленников, Л.Р. Абидуева // **Биофармацевтический журнал**. – 2022. – Т.14, №3. – С. 30-33.
8. Разуваева, Я.Г. Влияние экстракта сухого *Serratula marginata* на структуру тимуса и селезенки мышей при циклофосфановой иммуносупрессии / Я.Г. Разуваева, В.Б. Хобракова, А.Ц. Будацыренова, Д.Н. Оленников // **Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии**. – 2022. – №3. – С. 317-325.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОК – антителообразующая клетка; **АОС** – антиоксидантная система; **БАВ** – биологически активные вещества; **ВГ** – восстановленный глутатион; **ГЗТ** – гиперчувствительность замедленного типа; **ДМСО** – диметилсульфоксид**; ИР ГЗТ** – индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа; **КонА** – конканавалин А; **ЛПС** - липополисахарид; **МДА –** малоновый диальдегид; **ПМ** – перитонеальные макрофаги; **ПОЛ –** перекисное окисление липидов**; РТПХ –** реакция трансплантат против хозяина**; СОД –** супероксиддисмутаза; **ФИ** - фагоцитарный индекс; **ЦФ** – циклофосфамид**; ЯСК –** ядросодержащие клетки**.**