

УДК 615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СУХОГО ЭКСТРАКТА *COLURIA GEOIDES* (*ROSACEAE*), СТИМУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

© 2014 С.В. Дутова¹, Н.П. Неделькина¹, М.А. Мяделец², Ю.В. Ростовцева¹,
М.Р. Карпова³

¹ Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, г. Абакан

² Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Поступила в редакцию 09.12.2014

На мышах линии СВА/СaLac исследовано влияние фракций сухого экстракта *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на различные стадии клеточного иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа. Фракция водорастворимых биологически активных соединений наиболее активно стимулировала синтез провоспалительных цитокинов на стадии разрешения ГЗТ. В составе фракций идентифицированы фенолокислоты и флавоноиды. Считаем выделение из сухого экстракта *C. geoides* комплекса действующих веществ нецелесообразным, так как цельный экстракт обладает совокупными фармакологическими эффектами фракций.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, лекарственные растения, иммуностимулирующее действие

Состояние современных пациентов часто осложняется иммунодефицитами и нуждается в иммунокоррекции [6], поэтому важной задачей экспериментальной фармакологии является поиск новых и использование уже изученных лекарственных растений, обладающих иммуностимулирующим и иммунокорректирующим свойствами. Эфирномасличное растение сибирской флоры *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) – является перспективным источником биологически активных соединений (БАС) с противомикробной, иммуностимулирующей и иммунокорректирующей активностью, протективным действием при стафилококковой инфекции [1-4]. Сухой экстракт этого растения проявил стимулирующее действие в отношении клеточного иммунного ответа [5], что представляется важным и интересным фактом, так как влияние на клеточный иммунитет может лежать в основе протективного действия препарата против внутриклеточных паразитов и опухолевого перерождения клеток. При разработке любого фитопрепарата обязательно встает вопрос о природе действующих веществ.

Дутова Светлана Вячеславовна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фундаментальной медицины и гигиены. E-mail: coluria@mail.ru
Неделькина Наталья Петровна, аспирантка
Мяделец Марина Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фитохимии. E-mail: marinamyadelets@ya.ru
Ростовцева Юлия Владимировна, студентка
Карпова Мария Ростиславовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и фармакологии. E-mail: mrkarпова@mail.ru

Цель исследования: оценить влияние фракций сухого экстракта *C. geoides*, содержащих липо- и гидрофильные БАС, на различные стадии клеточного иммунного ответа.

Методика исследования. Сухой экстракт из сырья *C. geoides* (подземной и надземной части, собранных в июле 2013 г. в окр. д. Казановка, Республика Хакасия) получали методом перколяции 40% этанолом, высушивали до постоянной массы, стандартизовали по содержанию т-кумаровой кислоты (8,6%). Комплексы БАС получали из сухого экстракта последовательным фракционированием: С-1Е – 96% этанолом, С-1А – водой. Изучение состава фенольных соединений фракций проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе «Agilent 1200» с диодноматричным детектором и системой ChemStation. Для идентификации фенольных соединений использовали стандартные образцы фенолокислот, кумаринов и флавоноидов. Методом внутренней нормализации определяли относительное содержание отдельных идентифицированных фенольных веществ в исследуемом образце. Количественное содержание компонентов приводится в пересчете на государственный стандартный образец (ГСО) кверцетина.

Влияние фракций на клеточный иммунный ответ изучали на 60 мышах-самках линии СВА/СaLac массой 18–20 г в возрасте 2–2,5 месяцев, полученных из отдела экспериментального биомедицинского моделирования ФГБУ «НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга» СО РАМН

(г. Томск). Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией (Страсбург, 1986), из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Влияние препаратов на клеточный иммунный ответ изучали при постановке реакции гиперчувствительности замедленного типа [7]. Для этого мышей иммунизировали 100 мкл суспензии (1×10^7) эритроцитов барана (сенсibilизирующая доза). На 5 день после сенсibilизации под апоневротическую пластинку правой задней конечности вводили 20 мкл суспензии (1×10^8) эритроцитов барана (разрешающая доза), в контрлатеральную лапу – 20 мкл физиологического раствора. Учет интенсивности воспалительной реакции проводили через 24 часа, животных забивали, обе лапки отрезали на уровне голеностопного сустава и взвешивали на торсионных весах ВТ-500. Индекс воспаления (ИВ) определяли по разнице массы опытной (О) и контрольной (К) лапки индивидуально для каждого животного по формуле: $ИВ (\%) = (О-К)/К \times 100\%$. Оценивали влияние исследуемых препаратов на клеточный иммунный ответ на стадии сенсibilизации и на стадии разрешения. Исследуемые препараты вводили по двум схемам: до введения сенсibilизирующей дозы (1-ая схема введения) и перед введением разрешающей дозы (2-ая схема введения) в течение 5-ти дней внутрь желудка в дозе 50 мг/кг в виде раствора в дистиллированной воде. Животные контрольных групп получали вместо препарата растворитель в соответствующем объеме. Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 19, представляли в виде медианы с 25% и 75% процентилями. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, различия между выборками считали значимыми при $p \leq 0,05$.

На стадии сенсibilизации фракции С-1А и С-1Е достоверно угнетали процесс формирования клона антигенспецифических Т-лимфоцитов (табл. 1), что привело к снижению индекса воспаления в 2,1 и 4,3 раза соответственно. На стадии разрешения введение животным фракции С-1А привело к достоверной стимуляции воспалительной реакции: увеличению индекса воспаления в 2,1 раза. Введение фракции С-1Е несколько увеличивало индекс воспаления, но недостоверно. Сравнение полученных данных с результатами ранее проведенных исследований [5] свидетельствует о том, что фракции БАС сухого экстракта *C. geoides* влияют на клеточно-опосредованный иммунный ответ в целом так

же, как цельный экстракт, однако угнетающее действие на сенсibilизирующей стадии иммунного ответа выражено сильнее. Кроме того, фракция С-1А, содержащая гидрофильные БАС, проявляет более выраженное стимулирующее действие, направленное на синтез провоспалительных цитокинов на разрешающей стадии иммунного ответа.

Результаты исследования. В результате проведенных исследований было выявлено, что фракции сухого экстракта *C. geoides* оказывают влияние на развитие ГЗТ, выраженное на стадии сенсibilизации и на стадии разрешения (табл. 1).

Таблица 1. Влияние препаратов *C. geoides* на клеточный иммунный ответ при постановке реакции ГЗТ (Медиана (25%-75%), n=8-10)

Условия стимуляции	Индекс воспаления в реакции ГЗТ, %
1 схема ГЗТ	
Без стимуляции (контроль)	13,14 (8,36÷18,31)
С-1А	6,13 (4,38÷7,70)*
С-1Е	3,05 (0,96÷5,12)*
2 схема ГЗТ	
Без стимуляции (контроль)	12,25 (10,12÷15,45)
С-1А	25,60 (15,60÷37,70)*
С-1Е	16,70 (13,20÷20,00)

Примечание: * - различие достоверно при $p \leq 0,05$ с показателями контроля

Далее исследовали химический состав водной и этанольной фракций сухого экстракта *C. geoides*. По времени удерживания стандартных веществ и УФ-спектрам 7 соединений были идентифицированы как гликозиды кверцетина и кемпферола, ванилиновая, галловая, м-кумаровая, п-кумаровая, ванилиновая, эллаговая кислоты (табл. 2).

Следует отметить, что в водную фракцию в значительной степени переходит соединение II (81,0%), эллаговая (61,78), галловая (53,67) и м-кумаровая кислоты (43,19%), 20-гидроксизидон (100%); в этанольную фракцию сухого экстракта – соединение III (25,43%) кемпферол (16,88%), м-кумаровая кислота (36,41%). В составе изученных фракций БАС преобладают фенолокислоты (в том числе простые фенилпропаноиды – фенолкарбоновые кислоты), извлекаемые и этанолом, и водой. Эти вещества могут отвечать за фармакологическую активность изучаемых фитопрепаратов.

Выводы: считаем выделение из сухого экстракта *C. geoides* комплекса действующих веществ нецелесообразным, так как цельный экстракт обладает совокупными фармакологическими эффектами фракций.

Таблица 2. Содержание фенольных соединений фракций сухого экстракта *C. Geoides*

Соединение	Время удерживания (t _R), мин	Спектральные данные λ _{max} , нм	Содержание (% от общего содержания в сухом экстракте)	
			водная фракция С-1А	этанольная фракция С-1Е
галловая кислота	1,55	220, 280	53,67	18,27
<i>m</i> -кумаровая кислота	1,82	235, 320	43,19	36,41
ванилиновая кислота	4,83	210, 250, 290	19,54	8,42
соединение I	6,53	260, 330	31,65	21,46
<i>n</i> -кумаровая кислота	8,39	210, 290, 310	12,00	6,13
эллаговая кислота	21,60	255, 370	61,78	21,92
соединение II	32,18	290, 340	81,00	19,00
соединение III	36,90	255, 290	11,86	25,43
кверцетин	40,25	256, 370	11,64	6,30
соединение IV	44,45	220, 370	8,77	13,08
кемпферол	47,49	250, 360	11,13	16,88
соединение V	49,20	220, 370	17,68	3,92
соединение VI	51,80	255, 370	6,10	15,67

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Водолозова, С.В. Влияние препаратов колории гравилатовидной на фагоцитарную активность и цитокин-продуцирующую способность лейкоцитов периферической крови / С.В. Водолозова, Е.С. Агеева, Ю.В. Саранчина // Дни иммунологии в Сибири: мат-лы Всеросс. научно-практ. конф. с межд. участием (Абакан, 26-27 апреля 2011 г.). С. 192-194.
2. Водолозова, С.В. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С.В. Водолозова, М.А. Мяделец, М.Р. Карпова, Ю.В. Саранчина // Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 2. С.54-58.
3. Дутова, С.В. Иммунокорректирующее действие препаратов колории гравилатовидной при цитостатической болезни / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Дни иммунологии в Сибири: мат. Всеросс. научно-практ. конф. (г. Кызыл, 20-21 июня 2013 г.). С. 54-56.
4. Дутова, С.В. Протективное действие настойки *Coluria geoides* (Rosaceae) на модели генерализованной стафилококковой инфекции / С.В. Дутова, Н.П. Неделькина, М.Р. Карпова, В.Ю. Чумаков // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 3. С. 74-75.
5. Дутова, С.В. Влияние препаратов *Coluria geoides* (Rosaceae) на клеточный иммунитет / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8(17), № 2 (1). С. 51-53.
6. Лусс Л.В. Вторичная иммунная недостаточность и иммунокомпрометированный пациент. В чем проблемы? // Аллергология и иммунология в педиатрии. 2007. № 2 (11). С. 3-10.
7. Хаитов, Р.М. Методические указания по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ. В кн: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.М. Хаитов, И.С. Гуцин, Б.В. Пинегин, А.И. Зебров. – М.: Медицина, 2005. С. 505-506.

RESEARCH OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF *COLURIA GEOIDES* (ROSACEAE) DRY EXTRACT, STIMULATING THE CELLULAR IMMUNE ANSWER

© 2014 S.V. Dutova¹, N.P. Nedelkina¹, M.A. Myadelets², Yu.V. Rostovtseva¹, M.P. Karpova³

¹ Khakass State University named after N.F. Katanov, Abakan

² Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk

³ Siberian State Medical University, Tomsk

On mice of CBA/CaLac line influence of fractions of *Coluria geoides* (Rosaceae) extract on various stages of cellular immune answer in reaction of hypersensitivity of the slowed-down type is investigated. The fraction of water-soluble biologically active substances most actively stimulated synthesis of pro-inflammatory cytokines at a stage of DTH resolution. As a part of fractions phenolic acids and flavonoids are identified. We consider extraction from dry *C. geoides* extract the complex of active ingredients inexpedient as whole extract has aggregate pharmacological effects of fractions.

Key words: cellular immunity, herbs, immunotrophic action

Svetlana Dutova, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Department of Fundamental Medicine and Hygiene. E-mail: coluria@mail.ru; Nataliya Nedelkina, Post-graduate Student; Yuliya Rostovtseva, Student; Maria Karpova, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Microbiology and Pharmacology. E-mail: mrkarpova@mail.ru; Marina Myadelets, Candidate of Biology, Research Fellow at the Phytochemistry Laboratory. E-mail: marinamyadelets@ya.ru