

© Коллектив авторов, 2017
УДК 615.32: 612.017.1

Хобракова В.Б.^{1,2}, Цыренова Д.З.¹, Оленников Д.Н.¹

Иммунотомулирующая активность форситозидов В при экспериментальной иммуносупрессии

¹ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

² ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», 670000, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Смолина, 24а

Цель исследования — изучение иммуномодулирующего действия фенолпропаноида (форситозидов В, ForB), выделенного из клубней зопника клубненосного (*Phlomis tuberosa* (L.) Moench) на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии. **Методика.** Эксперименты проведены на 100 мышцах-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) массой 18—20 г. Иммунодефицит моделировали внутрижелудочным введением азатиоприна в дозе 50 мг/кг в течение 5 сут. (контрольная группа). Опытная группа животных получала ForB 1 раз в сутки внутрижелудочно в дозе 1 мг/кг в течение 14 сут. на фоне азатиоприновой иммуносупрессии. Интактная группа мышей получала очищенную воду по аналогичной схеме. Показатели клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ, гуморального звена — по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham (1965). Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. **Результаты.** Установлено, что курсовое применение форситозидов В способно ослаблять иммуносупрессивное действие цитостатика азатиоприна — индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа возрастал в 1,5 раза, абсолютное и относительное число антителообразующих клеток в 1,3 и 1,9 раза соответственно. **Заключение.** Форситозид В, выделенный из клубней *P. tuberosa* обладает иммуномодулирующим действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии, что обосновывает целесообразность его дальнейшего исследования для создания новых эффективных иммуномодуляторов.

Ключевые слова: форситозид В; *Phlomis tuberosa*; иммуномодулирующая активность; азатиоприн; иммуносупрессия; реакция гиперчувствительности замедленного типа; антителогенез.

Для цитирования: Хобракова В.Б., Цыренова Д.З., Оленников Д.Н. Иммуномодулирующая активность форситозидов В при экспериментальной иммуносупрессии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(3): 52—55. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.52-55

Для корреспонденции: Хобракова Валентина Бимбаевна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной фармакологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН, e-mail: val0808@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.02.2017

Khobrakova V.B.^{1,2}, Tsyrenova D.Z.¹, Olennikov D.N.¹

Immune modulating activity of forsythoside B at experimental immune suppression

¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAS, 6, ul. Sakh'yanovoi, Ulan-Ude, 670047, Russia

² Buryat State University, 24a, ul. Smolina, Ulan-Ude, 670000, Russia

The purpose of the study is to determine the immune modulating activity of phenylpropanoid (forysythoside B, ForB) isolated from the tubers of *Phlomis tuberosa* (L.) Moench (Lamiaceae) on the cellular and humoral immune response at the azathioprine immune suppression. **Methods.** Experiments were carried out on CBA male mice (n = 100, 18—20 g). Immune deficiency was modeled by the intragastrical introduction of azathioprine in the dose 50 mg/kg once a day for 5 days. The experimental group of animals administered ForB once a day intragastrically in dose 1 mg/kg for 14 days against the background of azathioprine immune suppression. The intact group administered the purified water according to the analogous scheme. The activity of the tested compound on the cellular immunity was evaluated in the reaction of delayed-type hypersensitivity (DTH) according to the standard method of local DTH. Condition of the humoral immunity was estimated by the number of antibody-forming cells (AFC) determined by the method of local hemolysis by A.J. Cunningham (1965). Statistical analysis was performed using standard methods of variation statistics using parametric Student's *t*-test. **Results.** It was established that the

administration of the ForB to animals significantly reduced suppressive effect of cytostatic azathioprine on the DTH reaction and antibody response. The use of the tested compound was resulted to the increase of the DTH-index (1.5 times) and the value of absolute and relative numbers of AFC in 1.3 and 1.9 times comparing with the control group. **Conclusion.** The results obtained allow to conclude that the ForB showed the marked immune modulating activity at the azathioprine-induced immune suppression demonstrating its perceptiveness as a new and effective immune modulators.

Keywords: forsythoside B; *Phlomis tuberosa*; immune modulating activity; azathioprine; immune suppression; delayed-type hypersensitivity response; antibody response.

For citation: Khobrakova V.B., Tsyrenova D.Z., Olennikov D.N. Immune modulating activity of forsythoside B at experimental immune suppression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 52–55. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.52-55

For correspondence: Valentina B. Khobrakova, Doctor of Biological Sciences, Senior staff scientist Federal State Budgetary Institution of Science «Institute of General and Experimental Biology» SB RAS; 6, ul. Sakh'yanovoi, Ulan-Ude, 670047, Russian Federation, e-mail: val0808@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Khobrakova V.B., <http://orcid.org/0000-0002-4689-5706>

Tsyrenova D.Z., <http://orcid.org/0000-0002-3383-5122>

Olennikov D.N., <http://orcid.org/0000-0001-8194-1061>

Received 02.02.2017

Введение

В связи с широким распространением иммунодефицитных состояний поиск веществ с иммуномодулирующими свойствами весьма актуален. Показано, что иммуностропной активностью обладают такие извлечения из лекарственных растений, как полифенольные соединения, полисахариды, эфирные масла, сапонины, витамины, различные макро- и микроэлементы [1–4]. Данные ряда работ свидетельствуют об иммуномодулирующих свойствах растительных фенилпропаноидов различных классов [5–10]. В качестве источника фенилпропаноидов представляет интерес сухой экстракт клубней *Phlomis tuberosa* (L.) Moench (*Lamiaceae*), содержащий не менее 3% фенилпропаноидов, в том числе форситозид В (ForB), актеозид (вербаскозид) и изоактеозид (изовербаскозид), а также иридоиды и полисахариды [11]. Ранее нами установлена иммуномодулирующая активность сухого экстракта из клубней *P. tuberosa* [11–13].

Цель исследования — определение иммуномодулирующих свойств ForB, доминирующего фенилпропаноида клубней *P. tuberosa*, в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии.

Методика

Растительное сырье. Клубни *P. tuberosa* были собраны в окрестностях с. Ошурково (Иволгинский район, Республика Бурятия, 15.IX.2011), очищены от грунта и высушены при 50°C до воздушно-сухого состояния.

Выделение ForB. ForB экстрагировали из измельченных клубней *P. tuberosa* (1,5 кг) 60% этанолом (1:15) при 50°C с применением УЗ-ванны (100 Вт, частота 35 кГц) в течение 60 мин дважды. Полученные извлечения объединяли и высушивали в вакууме. Сухой остаток ресуспендировали в смеси растворителей этилацетат-вода (1:1) до равновесного состояния, после чего органический слой отбирали, промывали водой и концентрировали в вакууме до полного высушивания. Этилацетатное извлечение подвергали твердофазной экстракции на полиамиде (400 г), как описано ранее [14], элюируя водой (2 л), 40% этанолом (5 л) и 85% этанолом (5 л). Фракции, полученные элюцией 40% этанолом, объединяли, концентрировали высушиванием и хроматографировали на Сефадексе LH-20 (5x80 см) с применением градиентной системы вода-этанол (100:0→5:95). Фракции, полученные в результате элюции 30% этанолом, рехроматографировали в тех же условиях. В результате получено 124 мг форситозид В (ForB), идентифицированного по данным температуры плавления, масс-спектрометрии, УФ- и ЯМР-спектроскопии [15].

Эксперименты проведены на мышках-самцах линии F1 (СВАХС57В1/6) массой 18–20 г (питомник РАН Столбовая). Животные находились в стандартных условиях вивария. Эксперименты проводили 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». Протокол исследований согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол №2 от 05.09.2013 г.). Из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом.

Действие ForB было изучено на интактных животных, а также животных, в состоянии иммунодепрессии. Иммуносупрессию вызывали введением цитостатика азатиоприна (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко», Россия, лекарственная форма — таблетки) в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сут. в течение 5 сут. [16]. ForB вводили иммуносупрессированным мышам в дозе 1 мг/кг перорально. Первое введение ForB осуществляли по окончании введения азатиоприна (АЗ), на 6-е сут. эксперимента и далее в течение 14 сут. 1 раз в сутки. Интактная группа животных получала по аналогичной схеме в соответствующем объеме очищенную воду. Действие ForB на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [17]. Мышей sensibilizировали внутрибрюшинным введением 0,1% взвеси эритроцитов барана в физиологическом растворе. На 4-е сут. под подошвенный апоневроз задней лапы вводили разрешающую дозу антигена — 50 мкл 50% взвеси эритроцитов барана. В контрольную лапу инъецировали физиологический раствор в том же объеме. Оценку реакции ГЗТ проводили спустя 24 ч по разнице масс опытной и контрольной лап. Индекс реакции ГЗТ (I_p) рассчитывали по формуле:

$$I_p = [(M_{оп} - M_k) / M_k] \times 100\%$$

где

$M_{оп}$ — масса опытной лапы,

M_k — масса контрольной лапы.

Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Сиппінгхам (1965) [18]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2×10^8 клеток/мышь. Величину иммунного ответа оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) на селезенку и на 10^6 клеток с ядрами на 5-е сутки после иммунизации.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического t критерия Стьюдента [19].

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния ForB на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемое вещество восстанавливает индекс данной реакции в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению индекса реакции ГЗТ на 39% по сравнению с тем же показателем в интактной группе (табл. 1). После введения животным опытной группы с иммунодепрессией, ForB в дозе 1 мг/кг отмечалось увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой.

При исследовании влияния ForB на процессы антителообразования установлено, что это вещество по-

Таблица 1

Влияние ForB на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа ($\pm SD$)

Группа животных	I_p , %
Интактная, n = 10	32,42 \pm 3,18
Контрольная (АЗ+H ₂ O), n = 10	19,77 \pm 1,40*
Опытная (АЗ+ForB), n = 10	29,44 \pm 1,71**

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с данными: * — интактной группы; ** — контрольной группы ($p \leq 0,05$), n — количество животных в группе.

Таблица 2

Изменение количества антителообразующих клеток (АОК) селезенки мышей под влиянием ForB на фоне приема азатиоприна ($\pm SD$)

Группа животных	Количество АОК на селезенку	Количество АОК на 10^6 спленоцитов
Интактная, n = 10	66591 \pm 4997	166,08 \pm 12,92
Контрольная (АЗ+H ₂ O), n = 10	40717 \pm 3387*	99,76 \pm 8,85*
Опытная (АЗ+ForB), n = 10	53125 \pm 2540**	187,37 \pm 18,11**

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с данными: * — интактной группы; ** — контрольной группы ($p \leq 0,05$), n — количество животных в группе.

вышает показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии (табл. 2). Введение азатиоприна приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и относительного (число АОК на 10^6 спленоцитов) на 39% и 40% соответственно, по сравнению с теми же показателями интактной группы.

Введение ForB на фоне иммуносупрессии статистически значимо увеличивало как абсолютное количество АОК, так и относительное при расчете на 10^6 спленоцитов; при этом 1-й показатель превышал уровень азатиоприновой супрессии в 1,3 раза, а 2-й — в 1,9 раза.

Таким образом, на основании проведенных исследований по выявлению иммуномодулирующей активности ForB установлено, что соединение обладает способностью восстанавливать показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Результаты проведенного исследования согласуются с ранее полученными данными об иммуномодулирующем действии фенилпропаноидов [6—9].

Заключение

Форситозид (ForB), выделенный из клубней *P.tuberosa*, обладает иммуномодулирующим действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии, что аргументирует целесообразность его дальнейшего изучения с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

References

1. Lazareva D.N., Plechev V.V., Morugova T.V., Samigullina L.I., *Plants, stimulating immunity. [Rasteniya, stimuliruyushchie immunitet]*. Ufa: «Bashkortostan»; 2005. (in Russian)
2. Paszkiewicz M., Budzyska A., Rozalska B., Sadowska B. The immunomodulatory role of plant polyphenols (Review). *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*. 2012; 66: 637-46.
3. Vajdy M. Immunomodulatory properties of vitamins, flavonoids and plant oils and their potential as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2011; 11(11): 1501-13.
4. Il'derbaev O.Z., Il'derbaeva G.O. The influence of the triterpenoid from *Betula pendula* on the reactivity of an organism exposed to action of the dust-radiating factor. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; 3: 47-8. (in Russian)
5. Kurkin V.A., Poroykov V.V. The phenylpropanoids of medicinal plants: the prognosis of the antioxidant and immunomodulating activities. *Sovremennye problemy nauki i obra-*

zovaniya. 2015; 2 Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22694>. (in Russian)

6. Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Suvorova A.V., Dubishchev A.V. Acute problems and development prospects of phytopharmacology and phytotherapy. *Meditinskiy al'manakh*. 2008; 4: 41-4. (in Russian)

7. Akbay P., Calis I., Undeger U., Basaran N., Basaran A.A. In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L. *Phytotherapy Research*. 2002; 16(6): 593-5.

8. Harmatha J., Zidek Z., Kmonickova E., Smidrkal J. Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. *Interdisciplinary Toxicology*. 2011; 4(1): 5-10.

9. Ahmad W., Jantan I., Kumolosasi E., Bukhari S.N.A. Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. *Drug Design, Development and Therapy*. 2015; 9: 2961-73.

10. da Costa-Silva T.A., Grecco S.S., de Sousa F.S., Lago J.H., Martins E.G., Terrazas C.A. et al. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha*. *Journal of Natural Products*. 2015; 78(4): 653-7.

11. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* on the fagocytic activity in experimental immunosuppression. In: *Materialy mezhdunarodnogo foruma «Klinicheskaya immunologiya i allergologiya — mezhdistsiplinarye problemy»*. Kazan'; 2014: 276-7. (in Russian)

12. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* (L.) Moench on the cellular chain of the immune response in experimental immunosuppression. In: *Proceedings of the VI International Scientific Conference «Traditional Medicine: Ways of Integration with Modern Health Care»*. Ulan-Ude; 2013: 97-8.

13. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* on the humoral immune response. In: *Proceedings of the Seventh International Symposium on Mongolian Medicine and Natural Medicine Inner Mongolia*, (Tongliao) First Mongolian Medicine Industry Expo. Tongliao; 2015: 475-8.

14. Olennikov D.N., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Tankhaeva L.M. Iridoids and Flavonoids of Four Siberian Gentians: Chemical Profile and Gastric Stimulatory Effect *Molecules*. 2015; 20: 19172-88.

15. Saracoglu I., Harput U.S., Calis I., Ogihara Y. Phenolic Constituents from *Phlomis lycia*. *Turkish journal of chemistry*. 2002; 26: 133-42.

16. Lazareva D.N., Alekhin E.K. *Immune stimulants. [Stimulyatory immuniteta]*. Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)

17. Mironov A.N., ed. *Guidelines for preclinical trials of drugs. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)

18. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibodyforming cells. *Nature*. 1965; 207(5001): 1106-7.

19. Lakin G.F. *Biometrics. [Biometriya]*. 4th ed. Moscow: «Vysshaya shkola»; 1990. (in Russian)

Сведения об авторах:

Цыренова Дарима Золтоевна, аспирант

Оленников Даниил Николаевич, доктор фарм. наук, вед. науч. сотр.