

© Коллектив авторов, 2018
УДК 615.32: 612.017.1

Хобракова В.Б.^{1,2}, Будаева Е.Р.¹

Влияние ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте

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

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

Цель исследования — определение иммуномодулирующих свойств ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из надземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.) при азатиоприновой иммуносупрессии. **Методика.** Опыты проведены на 100 мышах-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) массой 18—20 г. Иммунодефицит моделировали пероральным введением азатиоприна в дозе 50 мг/кг ежедневно в течение 5 сут. (контроль). Опытные группы животных на фоне азатиоприновой иммуносупрессии получали ориентин (15 мг/кг), гентиопикросид (12 мг/кг) и олеаноловую (4 мг/кг) 1 раз в сут. внутривентрикулярно в течение 14 сут. Интактная группа мышей получала очищенную воду по схеме. Действие испытуемых соединений на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ. Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Cunningham (1965). Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. **Результаты.** Установлено, что испытуемые биологически активные вещества: ориентин, гентиопикросид, олеаноловая кислота, способны снижать супрессивное действие цитостатика азатиоприна на клеточно-опосредованную иммунную реакцию и антителогенез, что проявляется в повышении индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа в 1,3—1,7 раза, абсолютного и относительного числа антителообразующих клеток в 1,6—1,8 раза по сравнению с контролем. Установлено, что наиболее выраженным иммуномодулирующим действием обладают ориентин и олеаноловая кислота. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что ориентин, гентиопикросид и олеаноловая кислота, выделенные из надземной части горечавки холодной *Gentiana algida*, обладают иммуномодулирующим действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии, что обосновывает целесообразность их дальнейшего исследования с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

Ключевые слова: ориентин; олеаноловая кислота; гентиопикросид; *Gentiana algida* Pall.; иммуномодулирующая активность; азатиоприн; иммуносупрессия; реакция гиперчувствительности замедленного типа; антителогенез.

Для цитирования: Хобракова В.Б., Будаева Е.Р. Влияние ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 54—58. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.54-58

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 03.02.2017

Khobrakova V.B.^{1,2}, Budaeva E.R.¹

Effects of orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from *gentiana algida* pall. on the immune system status in experiments

¹ Institute of General and experimental biology, Sakh'yarovoi str. 6, Ulan-Ude, 670047, Russia

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

The study objective was to evaluate the immune modulating effects of orientin, gentiopicroside, and oleanolic acid isolated from the aerial part of *Gentiana algida* Pall. on cellular and humoral immune responses in azathioprine immunosuppression. **Methods.** Experiments were carried out on CBA male mice (n = 100; 18—20 g). Immune deficiency was modeled by intragastrical administration of azathioprine 50 mg/kg once a day for 5 days. Experimental groups consisted of animals receiving orientin, gentiopicroside, and oleanolic acid (15, 12, and 4 mg/kg, respectively, once a day,

intragastrically, for 14 days) against the background of azathioprine immunosuppression. The intact group received purified water on the same schedule. Effects of the tested compounds on the cellular immunity status were evaluated in the reaction of delayed-type hypersensitivity (DTH) according to a standard method for local DTH. The humoral immunity status was evaluated by the number of antibody-forming cells determined by the method of local hemolysis by A.J. Cunningham (1965). Statistical analysis was performed using standard methods of variation statistics with a parametric Student's *t*-test. **Results.** The studied biologically active substances, orientin 15 mg/kg, gentiopicroside 12 mg/kg, and oleanolic acid 4 mg/kg, reduced the suppressive action of azathioprine on cell-mediated immune and antibody responses; the index of delayed type hypersensitivity reaction was 1.3 to 1.7 times increased; and both absolute and relative numbers of antibody-forming cells were 1.6 to 1.8 times increased as compared with the control group. Therefore, orientin and oleanolic acid rendered most pronounced immunomodulating effects. **Conclusion.** These results showed that orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from the aerial part of *Gentiana algida* displayed a marked immune modulating activity, which justifies their further study to create new, effective immune modulators.

Keywords: orientin; oleanolic acid; gentiopicroside; *Gentiana algida*; immune modulating activity; azathioprine; immune suppression; delayed-type hypersensitivity response; antibody response.

For citation: Khobrakova V.B., Budaeva E.R. The influence of orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from *Gentiana algida* Pall. on the state of immune system in the experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 54–58. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.54-58

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>

Budaeva E.R., <http://orcid.org/0000-0001-9348-2368>

Received 03.02.2017

Введение

Эффективность терапии заболеваний на фоне снижения иммунного статуса организма, зависит не только от вида патологии, факторов внешней среды, в том числе стресса, но и от применяемого медикаментозного лечения. На лекарственном рынке большинство иммуномодуляторов представлены средствами синтетического происхождения, длительное применение которых влечет за собой множество побочных эффектов. Иммунокорректирующие средства растительного происхождения обладают более мягким действием и низкой токсичностью, что делает возможным их продолжительное использование без риска развития побочных эффектов. Данные многочисленных исследований свидетельствуют, что иммуномодулирующей активностью обладают флавоноиды, фенолпропаноиды, дубильные вещества, полисахариды, тритерпеновые сапонины, эфирные масла, витамины и другие биологически активные компоненты растительного происхождения [1–7].

Объектами изучения иммунокорректирующего действия явились индивидуальные извлечения из надземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.) — ориентин, гентиопикрозид и олеаноловая

кислота. Индивидуальные соединения и суммарные препараты из *G. algida* обладают противовоспалительным [8], антифунгальным [9], противотрихомонадным [10], антибактериальным [11] и гемостатическим [12] действием. Ранее нами была установлена выраженная иммуномодулирующая активность сухого экстракта *Gentiana algida* Pall [13, 14]. Содержание в нем флавоноидов, тритерпенов и иридоидов составляло 86,91, 23,98 и 82,07 мг/г соответственно.

Цель работы — определение иммуномодулирующих свойств ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты, выделенных из надземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.), при азатиоприновой иммуносупрессии.

Методика

Эксперименты проведены на 100 мышах-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) массой 18–20 г. (Питомник «Столбовая»). Животные находились в стандартных условиях вивария в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (GLP) и приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты про-

ведены 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 № 7 от 12.11.2013.). Из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом.

Действие индивидуальных извлечений из надземной части *G. algida* на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета было изучено на животных в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном (50 мг/кг), который вводили контрольной группе животных перорально 1 раз в сут. в течение 5 сут. БАВ вводили опытным группам животных на фоне азатиоприна в экспериментально-терапевтических дозах: ориентин — 15 мг/кг, гентиопикрозид — 12 мг/кг, олеаноловая кислота — 4 мг/кг перорально 1 раз в сут. в течение 14 сут. Интактная и контрольная группы животных получали воду по аналогичной схеме.

Состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [15]. Мышей сенсibilизировали внутрибрюшинным введением 0,1%-ной взвеси эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе. На 4-е сут. под подошвенный апоневроз задней лапки вводили разрешающую дозу антигена — 50 мкл 50%-ной взвеси ЭБ. В контрлатеральную лапку 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.

Воздействие ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты из *G. algida* на состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антители-

образующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham [16]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2×10^8 клеток/мышь. Величину иммунного ответа оценивали по числу антителиобразующих клеток (АОК) на селезенку и на 10^6 клеток спленоцитов на 5-е сут. после иммунизации.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием непараметрического критерия U-Манна—Уитни. Различия между данными контроля и опыта считали статистически значимыми при вероятности 95% ($p \leq 0,05$) [17].

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния ориентина, олеаноловой кислоты и гентиопикрозида на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемые вещества в условиях азатиоприновой иммуносупрессии восстанавливают индекс данной реакции. Введение азатиоприна приводило к снижению индекса реакции ГЗТ (ИР ГЗТ) на 39% по сравнению с тем же показателем в интактной группе (табл. 1).

При введении ориентина, олеаноловой кислоты и гентиопикрозида опытным группам животных в дозах 15, 4, 12 мг/кг, соответственно, наблюдали увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,7; 1,4 и 1,3 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе (табл. 1).

При исследовании влияния индивидуальных извлечений из *G. algida* на процессы антителиобразования установлено, что данные вещества восстанавливают показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и числа АОК на 10^6 спленоцитов на 39% и 40% соответственно по сравнению с теми же показателями в интактной группе (табл. 2). При введении ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты на фоне супрессии наблюдали статистически значимое увеличение количества АОК в аб-

Таблица 1

Влияние ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты из *G. algida* на выраженность реакции ГЗТ

Группы животных	ИР ГЗТ, %
Интактная, n = 10	32,42 ± 3,18
Контрольная (азатиоприн), n = 10	19,77 ± 1,40*
Опытная 1 (азатиоприн + ориентин), n = 10	33,29 ± 2,61**
Опытная 2 (азатиоприн + олеаноловая кислота), n = 10	28,33 ± 2,73**
Опытная 3 (азатиоприн + гентиопикрозид), n = 10	24,94 ± 1,71**

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы по сравнению с данными: * — в интактной группе, ** — в контрольной группе, ($p < 0,05$, n — количество животных в группе).

Влияние ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты из *G. algida* на антителообразование

Группа животных	Абсолютное число АОК на селезенку	Число АОК на 10 ⁶ спленоцитов
Интактная, n = 10	66591 ± 4997	166,1 ± 12,9
Контрольная (азатиоприн), n = 10	40717 ± 3387*	99,8 ± 8,8*
Опытная 1 (азатиоприн + ориентин), n = 10	75642 ± 3986**	180,46 ± 11,03**
Опытная 2 (азатиоприн + олеаноловая кислота), n = 10	63000 ± 5685**	179,18 ± 16,27**
Опытная 3 (азатиоприн + гентиопикрозид), n = 10	56855 ± 5134**	164,6 ± 14,63**

солютных значениях в 1,86; 1,59; 1,62 раза и при расчете на 10⁶ спленоцитов — в 1,81; 1,65; 1,79 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе животных (табл. 2).

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что ориентин, гентиопикрозид и олеаноловая кислота, выделенные из *G. algida*, способны ослаблять супрессивное действие азатиоприна на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа; более выраженным эффектом обладают ориентин и олеаноловая кислота.

Результаты проведенного исследования согласуются с данными работ, в ходе которых было установлено иммуномодулирующее действие флавоноида ориентина, выделенного из листьев *Jatropha curcas* L. [18], флавоноидов ориентина и витексина из *Trollius chinensis* [19]. М. Bahgat и соавт. выявили иммуномодулирующее действие иридоидов, выделенных из листьев *Citharexylum quadrangular* [20]. В работах J. Wang и соавт. [21] и A. Jimenes-Arellanes и соавт. [22] установлен иммуномодулирующий эффект олеаноловой кислоты из *Ligustrum lucidum*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*. В исследованиях E.S. Yamamoto и соавт. показано, что использование тритерпеновой фракции, выделенной из листьев *Vaccaria uncinella*, повышает иммунный ответ у инфицированных мышей [23].

Таким образом, индивидуальные извлечения: ориентин, гентиопикрозид и олеаноловая кислота, выделенные из надземной части *G. algida*, обладают выраженным иммуномодулирующим действием, что позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения с целью создания новых растительных иммуномодулирующих препаратов.

References

- Han R., Wu W.Q., Wu X.P., Liu C.Y. Effect of total flavonoids from the seeds of *Astragalus complanatus* on natural killer cell function. *J. Ethnopharmacol.* 2015; 15(173): 157-65.
- Paszkiwicz M., Budzinska A., Rozalska B., Sadowska B. The immunomodulatory role of plant polyphenols (Review). *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej.* 2012; 66: 637-46.

- Kaleem Q.M., Akhtar M., Awais M.M., Saleem M., Zafar M., Iqbal Z. et al. Studies on *Embllica officinalis* derived tannins for their immunostimulatory and protective activities against coccidiosis in industrial broiler chickens. *The Scientific World Journal.* 2014; 378473. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/378473>.

- Danilets M.G., Belskiy Yu.P., Gur'ev A.M., Belousov M.V., Belskaya N.V., Trofimova E.S. et al. Effect of plant polysaccharides on Th1-dependent immune response: screening investigation. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2010; 73(6): 19-22. (in Russian)

- Zhang J., Cao W., Tian J., Yue R., Li L., Guo B. et al. Evaluation of novel saponins from *Psammosilene tunicoides* and their analogs as immunomodulators. *Int. Immunopharmacol.* 2012; 14(1): 21-6.

- Vajdy M. Immunomodulatory properties of vitamins, flavonoids and plant oils and their potential as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011; 11(11): 1501-13.

- 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)

- Khotsaev Zh.Ts. Anti-inflammatory activity of the dry extract from *Gentiana algida* Pall. *Razrabotka i vnedrenie novykh metodov i sredstv traditsionnoy meditsiny.* Moscow; 2001: 202-4. (in Russian)

- Tan R.X., Wolfender J.-L., Ma W.G., Zhang L.X., Hostettmann K. Secoiridoids and antifungal aromatic acids from *Gentiana algida*. *Phytochemistry.* 1996; 41: 111-6.

- Rubinichik M.A. Trihomonostatic properties of higher plants. *Phytotsidy.* Kiev; 1972: 128-32. (in Russian)

- Kornopoltseva T.V., Khotsaev Z.T., Aseeva T.A., Tankhaeva L.M. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of *Gentiana algida* Pall. and *Leucanthemum sibiricum* Dc. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* Irkutsk; 2007; 73(6): 82-5. (in Russian)

- Shishkina E.S., Nikitin Y.P., Sobolevskaya K.A., Potekhin K.G., Minaeva V.G., Izrailson V.F. *The study of natural and synthetic medicine. [Issledovanie lekarstvennykh preparatov prirodnogo i sinteticheskogo proiskhozhdeniya]*. Tomsk; 1975. (in Russian)

- Budaeva E.R., Khobrakova V.B. Immunomodulatory effect of the dry extract of *Gentiana algida* Pall. *Trudy mezhdunarodnogo foruma «Klinicheskaya immunologiya i allergologiya — mezhdistsiplinarnye problemy».* Kazan; 2014: 48-9. (in Russian)

- Budaeva E.R., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Gentiana algida* Pall. on the phagocytosis activity of macrophages at experimental immune suppression. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta.* Ulan-Ude; 2015; 12: 96-9. (in Russian)

15. Mironov A.N., ed. *Guidelines for conducting preclinical trials of medicinal products, part 1. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv, chast' I].* Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)

16. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells. *Nature*. 1965; 207: 1106 -7.

17. Sergienko V.I., Bondareva I.B. *Matematičeskaya statistika v kliničeskikh issledovaniyakh.* M.: GEOTAR-Media *The mathematical statistics in clinical research*, Moscow; GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)

18. Abd-Alla H.I., Moharram F.A., Gaara A.H., El-Safty M.M. Phytoconstituents of *Jatropha curcas* L. leaves and their immunomodulatory activity on humoral and cell-mediated immune response in chicks. *Zeitschrift fur naturforschung section c-a jornal of biosciences*. 2009; 64(7-8): 495-501.

19. An F., Wang S.H., Tian Q.Q., Zhu D.X. Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. *Oncology letters*. 2015; 10(4): 2627-33.

20. Bahgat M., Shalaby N.M., Ruppel A., Maghraby A.S. Humoral and cellular immune responses induced in mice by purified iridoid mixture that inhibits penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae upon topical treatment of mice tails. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2005; 35(2): 597-613.

21. Wang J., Shan A., Liu T., Zhang C., Zhang Z. In vitro immunomodulatory effects of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruit (*Ligustrum lucidum* supercritical CO₂ extract) on piglet immunocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2012; 14(4): 758-63.

22. Jimenez-Arellanes A., Luna-Herrera J., Cornejo-Garrido J., Lopez-Garcia S., Castro-Mussot M.E., Meckes-Fischer M. et al. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013; 7(13): 258.

23. Yamamoto E.S., Campos B.L., Laurenti M.D., Lago J.H., Grecco Sdos S, Corbett C.E. et al. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. *Parasitol. Res.* 2014; 113(1): 333-39.

Сведения об авторах:

Будаева Евдокия Ринчиновна, аспирант.