

615.015.45:615.273

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА И ГЕМОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИММУНОДЕФИЦИТЕ

© Цыдендамбаев Пурбо Будажапович

кандидат медицинских наук, старший преподаватель,
Бурятский государственный университет
Россия, 670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а
E-mail: purbo@yandex.ru

© Балданова Ирина Ринчиновна

кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой общей патологии человека,
Бурятский государственный университет
Россия, 670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а
E-mail: irrinchin@mail.ru

© Ерентуева Анна Юрьевна

кандидат педагогических наук, доцент,
Бурятский государственный университет
Россия, 670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а
E-mail: a_erentueva@mail.ru

© Абидуева Лыгжима Ранжуровна

кандидат биологических наук, старший преподаватель,
Бурятский государственный университет
Россия, 670002, г. Улан-Удэ, ул. Октябрьская, 36а
E-mail: abidueva75@mail.ru

Иммунитет, гемостаз и фибринолиз представляют единую клеточно-гуморальную защитную систему организма. Выявление механизмов иммунорегуляторного действия лекарственных растений является чрезвычайно актуальной задачей фитотерапии. Цель исследования состояла в оценке влияния экстрактов лекарственных растений Байкальского региона на показатели иммунитета и гемостаза при экспериментальном иммунодефиците — тимэктомии. Подопытным животным в течение 14 дней внутрижелудочно вводились экстракты эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* Moench.) (препарат сравнения), пятилистника кустарникового (*Penthaphylloides fruticosa* (L) O. Schwarz.), бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L) Fritsch.), шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* (L) Georgi.). В крови оценивали содержание про- (IL-1 β , IL-8, ФНО- α) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов, степень лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, показатели гемостаза и фибринолиза, а также массу иммунокомпетентных органов. Установлено, что тимэктомия приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов, падению интенсивности лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, редукции селезенки и изменению показателей гемостаза и фибринолиза в сторону гиперкоагуляции. Введение животным изучаемых экстрактов приводило к разносторонним эффектам. Экстракт пятилистника снижал продукцию провоспалительных цитокинов, увеличивая концентрацию противовоспалительного IL-10, нормализовал показатели лимфоцитарно-тромбоцитарной

адгезии, восстанавливал массу селезенки и показатели гемостаза. Бадан увеличивал продукцию IL-1 β и IL-10, также способствовал увеличению массы селезенки, оказывал слабое прокоагулянтное действие. Шлемник и эхинацея эффективно воздействовали на одни и те же звенья иммунитета и гемостаза, стимулируя лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию и увеличение содержания фибриногена в крови крыс.

Ключевые слова: тимэктомия; фитоэкстракты; цитокины; лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия; гемостаз; фибринолиз.

Введение. Величайшее разнообразие биологически активных веществ растительного мира представляет неисчерпаемый ресурс для исследователей. Попадая в организм человека, данные соединения проявляют широкий спектр активности, обусловленный их способностью взаимодействовать с различными по своей природе сайтами связывания на клетках органов и тканей, в том числе и клетках иммунной системы [1; 2]. Молекулярные и клеточные механизмы действия лекарственных растений на процессы пролиферации, кооперации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, продукцию ряда ключевых цитокинов, определяющих выбор типа иммунного ответа, до сих пор окончательно не ясны и нуждаются в дальнейшем экспериментальном обосновании. Системы иммунитета, гемостаза и фибринолиза представляют собой единую клеточно-гуморальную защитную систему организма [3].

Цель работы — оценить влияние экстрактов некоторых лекарственных растений Байкальского региона на показатели иммунитета и гемостаза при экспериментальном иммунодефиците.

Методика. Исследования проведены на 58 половозрелых белых крысах линии Wistar обоего пола массой 180–200 г. Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и приказу Минздрава России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Перед началом экспериментов животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределялись на группы с учетом возраста, массы и принципа рандомизации. Все манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977) и с соблюдением Европейской конвенции по защите животных (Страсбург, 1986). Тимэктомия проводилась по методике Т. Л. Соловьевой, 2006 [4]. Экспериментальные животные были распределены на следующие шесть групп: интактная (n=13), контрольная (крысы с индуцированной иммуносупрессией, вызванной тимэктимией, n=11), опытные группы — животные с иммуносупрессией, получавшие аптечный экстракт эхинацеи пурпурной (ЭП — *Echinacea purpurea* Moench.) (n=9), получавшие экстракт пятилистника кустарникового (ПК — *Penthaphylloides fruticosus* (L.) O. Schwarz) (n=9), получавшие экстракт бадана толстолистного (БТ — *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch.) (n=8), получавшие экстракт шлемника байкальского (ШБ — *Scutellaria baicalensis* (L.) Georgi.) (n=8). Фитоэкстракты получены И. Г. Николаевой (2001) [5]. Экстракты пятилистника и бадана содержат преимущественно дубильные вещества, экстракт шлемника — γ -пироновые соединения (флавоноиды).

Исследуемые экстракты растворяли в дистиллированной воде и вводили внутривентрикулярно утром и вечером в течение 14 дней в дозе 300 мг на 1 кг массы, кон-

трольная группа получала по аналогичной схеме эквивалентное количество воды дистиллированной. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением наборов фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск), показатели лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) — методом проф. Ю. А. Витковского и соавт. (2006) [6], показатели гемостаза (фибриноген, тромбиновое время (ТВ), протромбиновое (ПВ), активированное частичное тромбиновое время (АЧТВ), фибринолиз — реактивы «Технология-стандарт», Барнаул) — методами, описанными в руководстве по изучению системы гемостаза [7]. Для косвенной оценки иммуносупрессивного эффекта тимэктомии и влияния изучаемых экстрактов были оценены массы селезенки, надпочечников и брыжейки крыс.

Результаты всех измерений представлены в виде средних значений и стандартной ошибки ($M \pm m$). Исходные данные проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро — Уилка. Последующую обработку данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0» с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что у животных контрольной группы концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-8, ФНО- α) снижалась почти в два раза по сравнению с их значениями в группе интактных. Статистически значимых изменений в концентрациях противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) между данными группами не отмечено (табл. 1).

Таблица 1
Влияние фитоэкстрактов на цитокиновый профиль в сыворотке крови белых крыс, пг/мл ($M \pm m$)

Группы	Провоспалительные			Противоспалительные	
	IL-1 β	IL-8	ФНО- α	IL-4	IL-10
Интактная	15,84 \pm 0,56 [#]	12,82 \pm 0,69 [#]	13,23 \pm 0,45 [#]	7,52 \pm 0,47	<1
Контрольная	7,61 \pm 0,44	7,27 \pm 0,35	7,44 \pm 0,32	5,11 \pm 1,21	<1
ЭП	7,88 \pm 0,38	6,89 \pm 0,58	7,22 \pm 0,33	9,70 \pm 1,12*	<1
ПК	5,68 \pm 0,46*	4,73 \pm 0,44*	4,97 \pm 0,45*	10,54 \pm 0,97*	9,62 \pm 1,31*
БТ	9,47 \pm 0,71*	8,21 \pm 0,38	8,20 \pm 0,46	3,67 \pm 1,42	6,84 \pm 1,55*
ШБ	7,29 \pm 0,39	6,25 \pm 0,48	6,65 \pm 0,52	3,45 \pm 0,91	<1

Примечание: [#] — здесь и далее показаны статистически значимые различия между контрольной группой и интактной ($p \leq 0,05$); * — статистически значимые различия между опытными группами и контрольной ($p \leq 0,05$).

На продукцию цитокинов влияли все изученные фитоэкстракты, кроме экстракта шлемника байкальского. Под влиянием экстракта пятилистника кустарникового происходило наиболее выраженное ингибирование синтеза провоспалительных ци-

токинов. Так, содержание IL-1 β в крови животных, получавших ПК, снизилось в 1,3 раза, а концентрации IL-8 и ФНО- α — в 1,5 раза по сравнению с контролем. Причем экстракт ПК значительно усиливал продукцию противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10. Таким же эффектом обладали экстракты эхинацеи пурпурной и бадана толстолистного, стимулируя синтез IL-4 и IL-10 соответственно.

Как видно из таблицы 2, показатели лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в контрольной группе животных были в 2 раза ниже, чем в интактной. Экстракты ЭП, ШБ и ПК оказывали стимулирующее влияние на ЛТА, причем максимальным эффектом по данному тесту обладал экстракт ЭП (9,55 \pm 0,29). Значимого влияния бадана на них не отмечено.

Таблица 2
Влияние фитοэкстрактов на показатели ЛТА у белых крыс, М \pm m

Группы	n	ЛТА, %	ЛТИ
Интактная	13	4,07 \pm 0,28 [#]	3,11 \pm 0,18
Контрольная	11	2,05 \pm 0,27	2,45 \pm 0,38
ЭП	9	9,55 \pm 0,29*	2,44 \pm 0,19
ПК	9	5,22 \pm 0,57*	1,91 \pm 0,20
БТ	8	1,88 \pm 0,35	1,92 \pm 0,44
ШБ	8	7,22 \pm 0,41*	2,75 \pm 0,23

Для оценки иммуносупрессии и эффективности испытуемых фитοэкстрактов оценивалась масса иммунокомпетентных органов у крыс (табл. 3). Надпочечники не претерпели достоверных изменений в массе, введение животным экстрактов бадана и пятилистника привело к увеличению массы селезенки почти до значений в интактной группе. Масса брыжейки в группах, принимавших экстракты эхинацеи и шлемника, оказалась значительно ниже значений контрольной группы — 30 \pm 9 и 37 \pm 7 мг соответственно.

Таблица 3
Влияние фитοэкстрактов на изменения массы органов белых крыс, мг (М \pm m)

Группы	Селезенка	Надпочечники	Брыжейка
Интактная	930 \pm 42 [#]	107 \pm 22	147 \pm 31
Контрольная	787 \pm 25	80 \pm 15	96 \pm 25
ЭП	825 \pm 31	77 \pm 17	30 \pm 9*
ПК	910 \pm 33*	62 \pm 15	86 \pm 12
БТ	873 \pm 26*	64 \pm 13	52 \pm 11
ШБ	704 \pm 29	104 \pm 28	37 \pm 7*

Удаление центрального органа, ответственного за клеточный иммунитет, привело к развитию гиперкоагуляции (укорочение ТВ, ПВ и АЧТВ), снижению антикоагулянтной активности крови и торможению фибринолиза (табл. 4). Наиболее значимые изменения наблюдали в группе животных, получавших экстракт ПК, где пока-

затели коагуляции крови приближались к показателям в интактной группе. В других группах фибринолитическая активность оставалась угнетенной.

Таблица 4
Влияние фитоэкстрактов на показатели гемостаза и фибринолиза у белых крыс, (M±m)

Группы	ТВ (с)	ПВ (с)	АЧТВ (с)	XIIa-зависимый фибринолиз, (мин)	Эуглобулиновый фибринолиз, (мин)	Фибриноген, г/л
Интактная	29,3±3,1 [#]	29,8±1,5 [#]	28,3±1,1 [#]	74±19	183±32 [#]	2,83±0,19
Контрольная	21,7±1,4	25,2±1,3	25,5±0,7	96±27	238±16	3,12±0,18
ЭП	24,6±2,7	25,6±2,7	24,5±1,2	105±32	214±27	4,58±0,61*
ПК	34,5±3,6*	37,3±3,5*	32,5±3,3*	86±21	190±14*	9,63±1,37*
БТ	32,2±4,5*	31,2±4,2	27,4±2,4	112±33	233±44	5,75±0,72*
ШБ	26,8±3,2	24,4±2,1	25,9±1,5	89±17	229±37	4,71±0,53*

Слабыми прокоагулянтными свойствами обладал экстракт бадана толстолистного, увеличивая тромбиновое время. Изменения не коснулись показателей хагеманзависимого фибринолиза, но в то же время во всех опытных группах отмечено повышение концентрации фибриногена, причем максимальное трехкратное увеличение наблюдалось в группе животных, получавших экстракт пятилистника кустарникового. Полученные факты свидетельствуют о том, что использование экстракта пятилистника приводит к нормализации показателей гемостаза при данном виде экспериментального иммунодефицита. Ранее показано, что предварительное введение тимэктомизированным животным иммуномодулятора тималина, выделенного из вилочковой железы, а птицам — иммуномодулятора бурсилина, полученного из сумки Фабрициуса, не только ликвидирует явления гиперкоагуляции и депрессии фибринолиза, но и восстанавливает адекватный характер реагирования системы гемостаза на действие различных нейрогуморальных агентов [8].

Одним из новых высокоинформативных методов, дающих представление о состоянии иммунитета, является тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) [6], которая наблюдается на ранних стадиях развития воспаления за счет активации тромбоцитов под действием медиаторов воспаления, в том числе и цитокинов. Провоспалительные медиаторы, освобождаемые активированными моноцитами и макрофагами, такие как интерлейкины IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11 и TNF- α , а также эндотоксины в первую очередь воздействуют на эндотелий сосудов. В его клетках синтезируются молекулы адгезии, делающие поверхность эндотелия «липкой» — клетки приобретают провоспалительный и прокоагулянтный фенотип. Это, в свою очередь, приводит к активации тромбоцитов — ключевому событию не только гемостаза и тромбоза, но и воспалительного и иммунного ответов. В результате запускается замкнутый каскад реакций и возрастает риск тромботических осложнений [9].

В работе А. Н. Евстропова и соавт. (2004) показано интерфероногенное и иммуностимулирующее действие водорастворимого полифенольного комплекса из пятилистника кустарникового. Водный экстракт растения повышал антителообразующую активность клеток селезенки мышей, иммунизированных эритроцитами барана, и стимулировал клеточный иммунный ответ [10]. Исследования А. А. Чурина и соавт. (2005) в отношении полифенольного экстракта из бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia Fritsch.*) показали нормализующий эффект препарата на содержание антителообразующих клеток селезенки мышей при иммунодепрессии и стимуляции гуморального иммунитета. Экстракт бадана снижал выраженность воспалительных процессов в условиях реакции гиперчувствительности замедленного типа, препятствуя накоплению Т-лимфоцитов в очаге воспаления и подавляя способность этих клеток продуцировать провоспалительные цитокины [11].

Ранее нами в экспериментах *in vitro* показаны цитокин-стимулирующие эффекты экстрактов пятилистника кустарникового и шлемника байкальского на культуре мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров [12]. Кроме того, экстракты пятилистника и бадана вызывали увеличение продукции фактора Н — ключевого белка альтернативного пути активации системы комплемента, и неоптерина — косвенного показателя активации моноцитов-макрофагов [13]. Экстракт ШБ стимулировал продукцию оксида азота культивируемыми клетками.

Выявление механизмов регулирующего влияния растительных препаратов на клетки-эффекторы позволяет обосновать преимущественное направление их применения. Биологически активные вещества, содержащиеся в исследуемых экстрактах, связываясь со специфическими рецепторами (CD14, TLR-4), предположительно, могут приводить к выработке широкого спектра провоспалительных медиаторов, таких как цитокины (IL-1 β , TNF- α), неоптерин и нитросоединения. Увеличение или уменьшение синтеза цитокинов в присутствии экстрактов может быть связано с взаимодействием компонентов экстрактов с так называемыми Toll-подобными рецепторами (TLR) на мононуклеарах, так как известно, что при контакте соответствующего лиганда с TLR запускается сигнальный каскад, приводящий к активации транскрипционного фактора NF- κ B, что, в свою очередь, приводит к синтезу TNF- α и других провоспалительных цитокинов [14, 15].

Выводы. 1. Удаление центрального органа клеточного иммунитета проявляется значительными нарушениями в звеньях иммунитета и гемостаза у крыс, приводящими к изменениям цитокинового статуса и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии, массы иммунокомпетентных органов, развитию гиперкоагуляции, снижению антикоагулянтной активности крови и торможению фибринолиза.

2. Исследованные фитоэкстракты проявляют иммунопротективные свойства, выражающиеся в оригинальном воздействии на показатели цитокинового статуса и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии.

3. Экстракт пятилистника кустарникового нормализует показатели гемостаза и фибринолиза у тимэктомированных крыс.

Литература

1. Корепанов С. В., Опенко Т. Г. Применение лекарственных растений с иммуномодулирующими свойствами в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. 2012. № 11(4). С. 15–20.
2. Phytotherapy of cyclophosphamide-induced immunosuppression / K. Shirani [et al.] // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2015. № 39(3). С. 1262–1275.
3. Кузник Б. И., Цыбиков Н. Н., Витковский Ю. А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма // Тромбоз, гемостаз и реология. 2005. № 22(2). С. 3–16.
4. Соловьева Т. Л. Механизмы влияния эфферторов тонкого кишечника на неспецифические факторы защиты организма (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук / Чит. гос. мед. акад. Чита, 2006. 120 с.
5. Николаева И. Г., Хобракова В. Б., Арьяева М. М. Пятилистник кустарниковый (Курильский чай кустарниковый). Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2001. 110 с.
6. Витковский Ю. А., Кузник Б. И., Солпов А. В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии // Медицинская иммунология. 2006. № 8(5–6). С. 745–753.
7. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед-АО, 2001. 296 с.
8. Кузник Б. И., Цыбиков Н. Н. Аутоиммунные механизмы регуляции системы гемостаза // Сибирский онкологический журнал. 2005. № (13)1. С. 88–95.
9. Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis // Frontiers in Bioscience. 2005. № 11. С. 59–80.
10. Противозентеровирусная и иммуностимулирующая активность полифенольного комплекса, экстрагированного из пятилистника кустарникового (*Penthaphylloides fruticosus* (L.) O. Schwarz) / А. Н. Евстропов [и др.] // Вопр. вирусол. 2004. № 49(6). С. 30–33.
11. Влияние экстракта *Bergenia crassifolia* на показатели специфического иммунного ответа в условиях экстремальных воздействий / А. А. Чурин [и др.] // Эксп. и клин. фарм. 2005. № 68(5). С. 51–54.
12. Цыдендамбаев П. Б., Хышиктуев Б. С. Биологические эффекты экстрактов лекарственных трав в модели *ex vivo* // Дальневост. мед. журнал. 2008. № 3. С. 87–89.
13. Activated immune system and inflammation in healthy ageing: relevance for tryptophan and neopterin metabolism / L. Capuron [et al.] // Curr. Pharm. Des. 2014. № 20(38). P. 6048–6057.
14. Li J., Li J., Zhang F. The immunoregulatory effects of Chinese herbal medicine on the maturation and function of dendritic cells. // J. of Ethnopharm. 2015. № 171. С. 184–195.
15. Wen C., Chen H., Yang N. Chapter 6: Developing Phytochemicals from Medicinal Plants as Immunomodulators // Adv. in Botanical Res. 2012. № 62. P. 197–272.

EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS IN BAIKAL REGION: THEIR EFFECT ON THE IMMUNITY AND HEMOSTASIS INDICATORS IN CASE OF EXPERIMENTAL IMMUNODEFICIENCY

Purbo B. Tsydendambaev

Candidate of Medical Sciences, Senior Teacher of the Chair of General Human Pathology,
Medical Institute, Buryat State University
36a Oktjabrskaja st., Ulan-Ude, 670002 Russia
E-mail: purbo@yandex.ru

Irina R. Baldanova

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,

Head of the Chair of General Human Pathology,
Buryat State University
36a Oktjabrskaja st., Ulan-Ude, 670002 Russia
E-mail: irrinchin@mail.ru

Anna Yu. Erentueva
Candidate of Pedagogical Sciences, Associate Professor,
Faculty of General Human Pathology,
Buryat State University.
36a Oktjabrskaja st., Ulan-Ude, 670002 Russia
E-mail: a_arentueva@mail.ru

Lygzhima R. Abidueva
Candidate of Biological Sciences, Senior Teacher of the Chair of Infectious Diseases,
Buryat State University
36a Oktjabrskaja st., Ulan-Ude, 670002 Russia
E-mail: abidueva75@mail.ru

Immunity, hemostasis, and fibrinolysis are a unified cyto-humoral defensive system of the organism. The disclosure of immunoregulating effects of medicinal plants is an urgent problem for modern phytopharmacology. The purpose of the study was to estimate the effect of medicinal plant extracts from Baikal region on parameters of immunity and hemostasis in cases of experimental immunodeficiency induced by thymectomy. Extracts of *Echinacea purpurea* Moench (comparative drug), *Pentaphylloides fruticosa* (L) O.Schwarz., *Bergenia crassifolia* (L) Fritsch., and *Scutellaria baicalensis*(L) Georgi. were intragastrically administrated to experimental rats during 14 days. The content of pro- (IL-1 β , IL-8, TNF- α) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines, the degree of lymphocyte-platelet adhesion, parameters of hemostasis and fibrinolysis were determined in the blood as well as the weights of immunocompetent organs. It has been established that thymectomy results in decreased production of pro-inflammatory cytokines, decreased lymphocyte-platelet adhesion, spleen reduction, and the blood hypercoagulation. The *Pentaphylloides fruticosa* extract administration decreased the production of pro-inflammatory cytokines, increased the concentration of IL-10, normalized lymphocyte-platelet adhesion, restored the spleen mass and parameters of hemostasis. The administration of the *Bergenia crassifolia* extract led to increased production of IL-1 β and IL-10, increased the spleen mass and exerted a weak procoagulation effect. The *Scutellaria baicalensis* and *Echinacea purpurea* extracts promoted lymphocyte-platelet adhesion and increased the content of fibrinogen in the rat blood.

Keywords: thymectomy; phytoextracts; cytokines; lymphocyte-platelet adhesion; hemostasis; fibrinolysis.