

© Коллектив авторов, 2017

В. Б. Хобракова^{1, 3}, Е. Р. Будаева¹, Д. Н. Оленников¹, И. Н. Зилфикаров²

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА *GENTIANA ALGIDA* PALL.

¹ ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Россия, Улан-Удэ;
e-mail: evd_bud2688@mail.ru

² ФГБНУ ВИЛАР, Россия, Москва

³ ФГБОУ ВПО Бурятский государственный университет, Россия, Улан-Удэ

В опытах на мышах линии F1 (СВА × С57В1/6) установлена иммуномодулирующая активность сухого экстракта *Gentiana algida* Pall. (горечавка холодная) в отношении клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммунодепрессии. Показано, что испытуемое средство способно ослаблять супрессивное действие цитостатика азатиоприна на антителиогенез, клеточноопосредованную иммунную реакцию и фагоцитоз макрофагов, что выражается в повышении абсолютного и относительного числа антителиообразующих клеток, индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа, фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа по сравнению с уровнем супрессии. Согласно данным химических исследований для сухого экстракта *G. algida* характерно высокое содержание иридоидов (82,07 мг/г), флавоноидов (86,91 мг/г) и тритерпеновых соединений (23,98 мг/г), что обуславливает наличие у средства иммуномодулирующей активности.

Ключевые слова: *Gentiana algida* Pall.; иммуномодулирующая активность; иридоиды; флавоноиды; тритерпены; азатиоприн; иммуносупрессия.

В настоящее время рост числа заболеваний у людей, наряду с другими факторами, вызван снижением активности иммунного ответа организма. В связи с этим актуален поиск новых эффективных иммуномодуляторов, способных воздействовать только на измененные звенья иммунной системы. Многие исследования направлены на изучение иммуотропных свойств препаратов растительного происхождения. Растительные иммуномодулирующие препараты представляют собой комплекс биологически активных веществ в их природных сочетаниях, оказывающих эффективное воздействие на организм человека [1 – 3].

Объектом настоящего исследования явился сухой экстракт из надземной части *Gentiana algida* Pall. (*Pneumonanthe algida* (Pall.) F. W. Schmidt.; горечавка холодная, сем. Gentianaceae). Данное лекарственное растение широко применяется в традиционной тибетской медицине для лечения интоксикаций, при терапии заразных болезней и воспалении легких [4]. В результате химических исследований в траве *G. algida* установлено наличие флавоноидов (изоориентин, изоориентин-4'-*O*-глюкозид [5], ориентин [6]), ароматических кислот (анофиновая, фоманноксиновая) [6], иридоидов (гентиопикрозид [5], сверозид, трифлорозид, риндозид, амплексин-1-*O*-Glc, 2'-*O*-2,3-дигидроксибензоил-сверозид [6], 6'-*O*-2,3-дигидроксибензоил-сверозид, 6'-*O*-2,3-дигидроксибензоил-сверциамарин [7]), тритерпенов (олеаноловая кислота) и стеролов (ситостерин, даукостерол, стигматерол) [6].

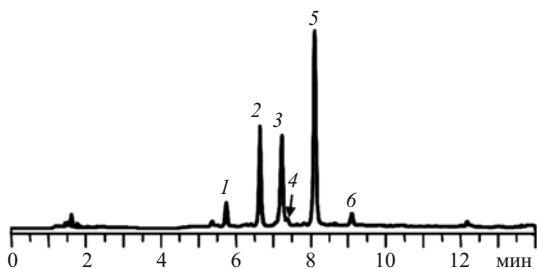
Исследования биологической активности суммарных препаратов и индивидуальных соединений из *G. algida* показали наличие противовоспалительного, антибактериального [8], гемостатического [9], противотрихомонадного [10], антифунгального [6] и противовоспалительного действия [11].

Высокая эффективность сухого экстракта *G. algida* при воспалительных заболеваниях, в патогенезе которых ведущую роль отводят нарушениям иммунной системы организма, предполагает наличие у экстракта иммуномодулирующих свойств.

Целью настоящего исследования явилось определение иммуномодулирующего действия сухого экстракта *G. algida* на показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа в условиях экспериментальной иммуносупрессии.

На предварительном этапе исследования нами изучен химический состав экстракта *G. algida* с применением комплекса хроматографических методов. В результате было выделено 7 доминирующих соединений, относящихся к классам тритерпеновых соединений (олеаноловая кислота), иридоидов (гентиопикрозид, сверозид, логановая кислота) и флавоноидов (ориентин, изоориентин, изоориентин-4'-*O*-глюкозид). Учитывая известные сведения из литературы о компонентах *G. algida*, можно утверждать, что логановая кислота впервые обнаружена в данном растительном объекте.

Количественное содержание выделенных соединений определяли с применением МК-ВЭЖХ-УФ (фла-



Хроматограмма (МК-ВЭЖХ-УФ) экстракта *G. algida* при 254 нм: 1 — логановая кислота; 2 — изоориентин-4'-*O*-глюкозид; 3 — гентиопикрозид; 4 — сверозид; 5 — ориентин, 6 — изоориентин.

воноиды, иридоиды) и ВЭТСХ-денситометрии (олеаноловая кислота). На рисунке представлена хроматограмма (МК-ВЭЖХ-УФ) экстракта *G. algida*.

В результате проведенных исследований установлено, что доминирующими соединениями экстракта *G. algida* являются гентиопикрозид (75,50 мг/г), ориентин (65,23 мг/г) и олеаноловая кислота (23,98 мг/г), общая концентрация которых составила более 16 % от массы экстракта (табл. 1). Суммарное содержание иридоидов, флавоноидов и тритерпеновых соединений в экстракте *G. algida* — 82,07, 86,91 и 23,98 мг/г соответственно.

Экспериментальная химическая часть

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, Россия); МС-анализ — на масс-спектрометре высокого разрешения МАТ 8200 (Finnigan). ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 (Симекс, Россия) в таблетке с KBr (1:100), спектры ЯМР — на ЯМР-спектрометре VXR 500S (Varian).

В работе использовали ацетонитрил (НПК Криохром, Россия; сорт 0), LiClO₄, HClO₄, воду для ВЭЖХ Chromasolv (Sigma, Швейцария), логановую кислоту, гентиопикрозид, сверозид, ориентин, изоориентин (Extrasynthese, Франция); изоориентин-4'-*O*-глюкозид выделен ранее из *Anagallidium dichotomum* [12]; ос-

тальные реагенты имели чистоту ч.д.а. Для колоночной хроматографии применяли силикагель, обращенно-фазовый силикагель (Sigma, Швейцария), Сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция), полиамид (Woelm, Германия).

Получение экстракта. Воздушно-сухое сырье (надземная часть) *G. algida* была приобретена в ЗАО “Этношоп” (Иркутск, Россия). Для получения сухого экстракта измельченное сырье экстрагировали двукратно 60 % этанолом в соотношении сырье — экстрагент 1:15 на водяной бане (50 °С) при постоянном перемешивании в течение 60 мин. Объединенное извлечение концентрировали в вакууме (45 °С) до водного остатка, который лиофильно высушивали. Выход сухого экстракта — 37–38 % от массы растительного сырья.

Фракционирование экстракта *G. algida*. Суспендировали 100 г сухого экстракта в 500 мл дистиллированной воды и полученную суспензию обрабатывали последовательно хлороформом, этилацетатом и бутанолом. Органические извлечения концентрировали в вакууме до полного удаления растворителей. В результате получены хлороформная (9,5 % от массы воздушно-сухого сырья), этилацетатная (18,2 %) и бутанольная фракции (36,9 %). Далее фракции хроматографировали с применением колоночной хроматографии на обращенно-фазовом силикагеле (3 × 100 см, элюент H₂O – MeCN 100:0 → 0:100). Полученные подфракции рехроматографировали на полиамиде (2 × 60 см, элюент H₂O – EtOH 100:0 → 96:4), силикагеле (3 × 50 см, элюент C₆H₁₄ – EtAc 100:0 → 70:30, EtAc – EtOH 100:0 → 70:30), Сефадексе LH-20 (3 × 50 см, элюент EtOH – H₂O 96:4 → 0:100). В результате выделено 7 соединений, идентифицированных по данным УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопии как олеаноловая кислота (1,54 г) [13], логановая кислота (12 мг), гентиопикрозид (264 мг), сверозид (24 мг) [14], ориентин (3,47 г), изоориентин (252 мг), изоориентин-4'-*O*-глюкозид (728 мг) [15].

Количественный анализ флавоноидов и иридоидов проводили методом микроколоночной ВЭЖХ-УФ (МК-ВЭЖХ-УФ) на жидкостном хроматографе Милихром А-02 (ЗАО ЭкоНова, Россия), оснащенный двухкомпонентным градиентным насосом, автосемплером, спектрофотометрическим детектором и термостатируемой стальной колонкой (2 × 75 мм), упакованной сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 (Metrohm AG, Швей-

Таблица 1
Содержание индивидуальных соединений в экстракте *G. algida*

Соединение	Содержание, мг/г	Суммарное содержание, мг/г
Иридоиды		
Логановая кислота	5,63 ± 0,12	
Гентиопикрозид	75,50 ± 1,59	82,07
Сверозид	0,94 ± 0,03	
Флавоноиды		
Ориентин	65,23 ± 1,37	
Изоориентин	8,89 ± 0,17	86,91
Изоориентин-4'- <i>O</i> -глюкозид	12,79 ± 0,21	
Тритерпеновые соединения		
Олеаноловая кислота	23,98 ± 0,59	23,98
Суммарное содержание идентифицированных компонентов		192,96

Таблица 2
Влияние экстракта *G. algida* (ЭГХ) на выраженность реакции ГЗТ

Группа животных	ИР ГЗТ, %
Интактная, n = 10	32,42 ± 3,18
Контрольная (азатиоприн), n = 10	19,77 ± 1,40
Опытная (азатиоприн + ЭГХ), n = 10	30,56 ± 1,18*

Здесь и далее: * различия достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с данными в контрольной группе, число животных в каждой группе ($n = 10$).

Таблица 3
Влияние экстракта *G. algida* (ЭГХ) 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 (азатиоприн + ЭГХ), n = 10	67125 ± 4845*	185,7 ± 14,5*

цария; Ø 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали градиентную систему 0,2 М LiClO₄ в 0,006 М HClO₄ (элюент А) — ацетонитрил (элюент В); режим элюирования 5 – 80 % В 0 – 26 мин. Температура колонки 35 °С, скорость подвижной фазы 150 мкл/мин, длина волны детектора 254 нм. Объем инжестируемой пробы — 1 мкл. Расчет содержания индивидуальных компонентов проводили по градуировочным графикам, построенным с применением стандартных образцов соединений с чистотой ≥ 95 %.

Количественный анализ олеаноловой кислоты проводили методом ВЭТСХ-денситометрии, как описано ранее [16].

Экспериментальная биологическая часть

Эксперименты проведены на мышах-самцах линии F₁ (СВА × С57В1/6) массой 18 – 20 г. Действие экстракта *G. algida* на показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунитета изучали на животных, находящихся в состоянии иммунодепрессии, вызванной азатиоприном (ОАО “Мосхимфармпрепараты” им. Н. А. Семашко”, лекарственная форма — таблетки), который вводили контрольной группе животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Экстракт *G. algida* вводили опытной группе животных на фоне азатиоприна в экспериментально-терапевтической дозе 200 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 14 дней. Интактная и контрольная группы животных получали воду очищенную по аналогичной схеме.

Действие экстракта *G. algida* на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [17]. Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по [18]. Состояние макрофагального звена иммунного ответа определяли в реакции фагоцитоза перитонеальных макрофагов в отношении *Staphylococcus aureus* по методике Фрейдлин, оценивая показатели фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа [19].

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента [20].

Таблица 4
Влияние экстракта *G. algida* (ЭГХ) на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

Группа животных	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число
Интактная, n = 10	81,8 ± 2,4	7,8 ± 0,6
Контрольная (азатиоприн), n = 10	42,4 ± 1,5	3,9 ± 0,3
Опытная (азатиоприн + ЭГХ), n = 10	85,8 ± 4,8*	6,6 ± 0,5*

Результаты и их обсуждение

При исследовании влияния экстракта *G. algida* на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что испытуемое средство в дозе 200 мг/кг восстанавливает индекс данной реакции в условиях азатиоприновой иммуносупрессии, что выражается в увеличении показателя в 1,6 раза по сравнению с контролем (табл. 2).

При исследовании влияния экстракта *G. algida* на процессы антителообразования установлено, что данное средство восстанавливает показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. При введении исследуемого сухого экстракта на фоне иммуносупрессии наблюдали достоверное увеличение количества АОК в абсолютных значениях и при расчете на 10⁶ спленоцитов в 1,7 и в 1,9 раза соответственно (табл. 3).

При исследовании влияния экстракта *G. algida* на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей в отношении *Staphylococcus aureus* установлено, что данное средство увеличивает фагоцитарный индекс и фагоцитарное число в 2,0 и 1,7 раза, соответственно, по сравнению с данными в контрольной группе (табл. 4).

Полученные данные позволяют заключить, что экстракт *G. algida* способен ослаблять супрессивное действие азатиоприна на показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа. Эффективность экстракта, по-видимому, обусловлена содержанием в нем флавоноидов (ориентин, изоориентин, изоориентин-4'-*O*-глюкозид) [21], тритерпеновых соединений (олеаноловая кислота) [22, 23] и иридоидов (логановая кислота, гентиопикрозид, сверозид) [24], обладающих иммуномодулирующими свойствами.

Таким образом, экстракт *G. algida* является эффективным иммунокорректирующим средством, что позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения с целью создания новых растительных иммуномодулирующих препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Н. Лазарева, В. В. Плечев, Т. В. Моругова, Л. И. Самигуллина, *Растения, стимулирующие иммунитет*, Башкортостан, Уфа (2005).

2. С. Н. Лебедева, М. А. Хребтовский, *Сиб. мед. ж.*, **63**, 69 – 72 (2006).
3. А. А. Чурин, Н. В. Масная, Е. Ю. Шерстобоев, И. В. Шилова, *Эксперим. клин. фармакол.*, **71**(5), 32 – 36 (2008).
4. С. М. Баторова, Г. П. Яковлев, Т. А. Асеева, *Справочник лекарственных растений традиционной тибетской медицины*, Наука, Новосибирск (2013).
5. M. Hostettmann-Kaldas, K. Hostettmann, O. Sticher, *Phytochemistry*, **20**, 443 – 446 (1981).
6. R. X. Tan, J.-L. Wolfender, W. G. Ma, et al., *Phytochemistry*, **41**, 111 – 116 (1996).
7. R. X. Tan, J. Hu, L. D. Kong, et al., *Planta Med.*, **63**, 567 – 569 (1997).
8. Т. В. Корнопольцева, Ж. Ц. Хоцаев, Т. А. Асеева, Л. М. Танхаева, *Сиб. мед. ж.*, **73**, 82 – 85 (2007).
9. Е. С. Шишкина, Ю. П. Никитин, К. А. Соболевская и др., *Исследование лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения*, Томск (1975).
10. М. А. Рубинчик, *Трихомноостатические свойства высших растений*, Фитонциды, Киев (1972).
11. Ж. Ц. Хоцаев, *Разработка и внедрение новых методов и средств традиционной медицины*, Москва (2001).
12. D. N. Olennikov, *Chem. Nat. Comp.*, **49**, 1137 – 1139 (2013).
13. D. N. Olennikov, L. M. Tankhaeva, *Chem. Nat. Comp.*, **41**, 600 – 601 (2005).
14. L. J. El-Naggar, J. L. Beal, *J. Nat. Prod.*, **43**, 649 – 707 (1980).
15. C. A. Williams, B. G. Murray, *Phytochemistry*, **11**, 2507 (1972).
16. D. N. Olennikov, L. M. Tankhaeva, V. V. Partilkhaev, A. V. Rokhin, *Braz. J. Pharmacogn.*, **22**, 490 – 496 (2012).
17. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, часть 1, Миронов А. Н. (ред.), Министерство здравоохранения и социального развития РФ, ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва (2012).
18. A. J. Cunningham, *Nature*, **207**, 1106 – 1107 (1965).
19. И. С. Фрейдлин, *Использование культуры мышинных перитонеальных макрофагов в качестве модели для изучения клеток мононуклеарной фагоцитарной системы организма и их изменений под влиянием биологически активных веществ: Методические рекомендации*, Ленинград (1976).
20. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1990).
21. S. Sahreen, M. R. Khan, R. A. Khan, N. A. Shah, *BMC Compl. Altern. Med.*, **13**, 372 (2013).
22. C. Sánchez-Quesada, A. López-Biedma, J. J. Gaforio, *Evid.-Based Compl. Altern. Med.*, 654721 (2015).
23. P. Bhandari, N. K. Patel, R. P. Gangwal, et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **24**, 4114 – 4119 (2014).
24. E. L. Ghisalberti, *Phytomedicine*, **5**, 147 – 163 (1998).

Поступила 30.04.15

IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF *GENTIANA ALGIDA* PALL. EXTRACT

V. B. Khobrakova^{1,3}, E. R. Budaeva¹, D. N. Olennikov¹, and I. N. Zilfikarov²

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Buryat Republic, 670047 Russia

² Scientific Center of Biomedical Technologies, State Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, 117216 Russia

³ Buryat State University, Ulan-Ude, Buryat Republic, 670000 Russia

Immunomodulating activity of the dry extract of *Gentiana algida* Pall. was investigated in experiments on F1 line (CBA C57BL/6) mice with experimental azathioprine-induced immunosuppression of cellular, humoral, and macrophage components of immune response. It was found that the plant extract reduced the suppressive effect of cytostatic azathioprine on antibody response, cell-mediated immune reaction, and macrophage phagocytosis. This resulted in increase of the absolute and relative amount of antibody-forming cells, index of delayed-type hypersensitivity, phagocytic index, and phagocytic number as compared to those on the suppression level. The *G. algida* dry extract is characterized by a high content of iridoids (82.07 mg/g), flavonoids (86.91 mg/g) and triterpenes (23.98 mg/g), which cause the observed immunomodulating activity.

Keywords: *Gentiana algida* Pall.; immunomodulating activity; iridoids; flavonoids; triterpenes; azathioprine; immunosuppression.