

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ α -4,6-ГЛЮКАНА ИЗ КЛУБНЕЙ *PHLOMOIDES TUBEROSA* (L.) MOENCH

В.Б. Хобракова

д.б.н., доцент, ст. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной фармакологии, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ)
E-mail: val0808@mail.ru

Д.З. Цыренова

аспирант, лаборатория экспериментальной фармакологии, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ)
E-mail: dtsyrenova@mail.ru

Д.Н. Оленников

д.фарм.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория медико-биологических исследований, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ)

Изучено иммуномодулирующее действие α -4,6-глюкана, выделенного из клубней *Phlomis tuberosa* (L.) Moench (Lamiaceae), при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии. Показано, что α -4,6-глюкан способен ослаблять супрессивное действие цитостатика азатиоприна на реакцию гиперчувствительности замедленного типа, антителиогенез и фагоцитарную активность макрофагов.

Ключевые слова: *Phlomis tuberosa* (L.) Moench, иммуномодулирующая активность, полисахариды, α -4,6-глюкан, иммуносупрессия, азатиоприн, гиперчувствительность замедленного типа, антителиобразующие клетки, фагоцитоз.

В настоящее время одной из актуальных задач иммунофармакологии является разработка новых иммуномодуляторов, сочетающих в себе такие важнейшие характеристики, как эффективность и безопасность применения. В последние годы пристальное внимание исследователей привлекают работы по изучению иммуотропных свойств полисахаридов растительного происхождения. По сравнению с синтетическими и бактериальными полисахаридами, полимеры растительного происхождения мягко воздействуют на организм, малотоксичны, могут применяться у лиц с сочетанными патологиями, а также оказывают устойчивый терапевтический эффект, что даёт им значительные преимущества при разработке иммуномодулирующих средств [1–5].

В качестве источника полисахаридов представляют интерес клубни зопника клубненосного – *Phlomis tuberosa* (L.) Moench (Lamiaceae), сухой экстракт из которых обладает иммуномодулирующей активностью [6]. Исследования химического состава клубней *P. tuberosa* показали высокое содержание полисахаридов, в составе которых доминирующим был α -4,6-глюкан [7, 8]. Ранее авторами была установлена выраженная иммуномодулирующая активность α -4,6-глюканов из *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), *Sophora fla-*

vescens Soland. (Fabaceae) и *Elettaria cardamomum* (L.) Matton (Zingiberaceae) [2, 3].

Цель исследования – определение иммуномодулирующих свойств α -4,6-глюкана из клубней *Phlomis tuberosa* в отношении клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа при азатиоприновой иммуносупрессии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на мышах-самцах линии F1 (СВА×С57В1/6) массой 18–20 г (Филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА). 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 осуществляли 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.

Полисахарид (α -4,6-глюкан) из клубней *P. tuberosa* был получен методом экстракции водой с последующим осаждением этанолом и очисткой гель-хроматографией [2, 3].

Действие α -4,6-глюкана было изучено на животных, находящихся в состоянии иммуносупрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко», Россия, лекарственная форма – таблетки), который вводили контрольной и опытным группам животных в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней [9]. Мышам, подвергнутым иммуносупрессии, вводили α -4,6-глюкан в дозе 1 мг/кг перорально. Первое введение осуществляли по окончании введения азатиоприна (АЗ), на 6-й день эксперимента и далее в течение 14 дней 1 раз в сутки. Интактная группа животных получала по аналогичной схеме в соответствующем объеме очищенную воду.

Действие α -4,6-глюкана на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [10]. Мышей сенсибилизировали внутрибрюшинным введением 0,1%-ной взвеси эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе. На 4-е сутки 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. Оценка 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. Cunningham (1965) [11]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток/мышь. Величину иммунного ответа оценивали по количеству АОК на селезенку и на 10^6 клеток с ядрами на 5-е сутки после иммунизации.

Состояние макрофагального звена иммунного ответа оценивали в реакции фагоцитоза перитоне-

альных макрофагов в отношении частиц коллоидной туши. Оптическую плотность лизата клеток перитонеального экссудата, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными макрофагами, определяли при длине волны 620 нм [10].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании влияния α -4,6-глюкана 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, подвергшимся иммунодепрессии, α -4,6-глюкана в дозе 1 мг/кг отмечалось увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,5 раза по сравнению с данными контрольной группы животных.

При исследовании влияния α -4,6-глюкана на процессы антителообразования установлено, что данное вещество повышает показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению как абсолютного количества АОК, так и количества АОК на 10^6 спленоцитов на 39 и 40% соответственно, по сравнению с теми же показателями в интактной группе (табл. 2).

Таблица 1. Влияние α -4,6-глюкана на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа ($M \pm m$)

Группа животных	I_p , %
Интактная ($n = 10$)	$32,42 \pm 3,18$
Контрольная (АЗ+Н ₂ O) ($n = 10$)	$19,77 \pm 1,40^*$
Опытная (АЗ+ α -4,6-глюкан) ($n = 10$)	$30,28 \pm 1,58^{**}$

Примечание: здесь и далее различия достоверны по сравнению с данными: * – в интактной группе, ** – в контрольной группе при $p < 0,05$; n – число животных в группе.

Таблица 2. Влияние α -4,6-глюкана на антителообразование ($M \pm m$)

Группа животных	Количество АОК на селезенку	Количество АОК на 10^6 спленоцитов
Интактная ($n = 10$)	66591 ± 4997	$166,08 \pm 12,92$
Контрольная (АЗ+Н ₂ O) ($n = 10$)	$40717 \pm 3387^*$	$99,76 \pm 8,85^*$
Опытная (АЗ+ α -4,6-глюкан) ($n = 10$)	$63046 \pm 5020^{**}$	$177,37 \pm 15,11^{**}$

Таблица 3. Влияние α -4,6-глюкана на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при азатиоприновой супрессии ($M \pm m$)

Группа животных	Фагоцитарный индекс, усл.ед.
Интактная ($n = 10$)	0,369 \pm 0,0158
Контрольная (АЗ+Н ₂ O) ($n = 10$)	0,249 \pm 0,026*
Опытная (АЗ+ α -4,6-глюкан) ($n = 10$)	0,376 \pm 0,026**

При введении α -4,6-глюкана на фоне иммуносупрессии наблюдали достоверное увеличение количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10^6 спленоцитов; при этом первый показатель превышал уровень азатиоприновой супрессии в 1,5 раза, а второй – в 1,8 раза.

Введение азатиоприна приводило к снижению фагоцитарного индекса на 32% по сравнению с данными в интактной группе. При введении мышам, подвергнутым иммунодепрессии, α -4,6-глюкана наблюдали увеличение фагоцитарного индекса в 1,5 раза по сравнению с данными в контрольной группе (табл. 3).

Результаты проведенного исследования согласуются с данными исследований *in vitro* X.J. Li et al. (2016), демонстрирующими иммуномодулирующее действие полисахаридов, в которых установлено, что α -глюканы, выделенные из *Lobelia chinensis* Lour. (Campanulaceae), усиливают пролиферацию макрофагов, фагоцитоз, продукцию оксида азота и секрецию цитокинов [4]. В исследовании V.Vetvicka, J. Vetvickova (2014) обнаружено, что комбинация α -глюканов, выделенных из грибов *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Omphalotaceae) и *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray (Fomitopsidaceae), в опытах *in vitro* усиливают фагоцитоз, активность естественных киллеров, а также секрецию IL-6, IL-12, IFN- γ [5]. В работах В.Б. Хобраковой и др. (2010, 2012) установлено иммуномодулирующее действие α -глюканов, выделенных из *Scutellaria baicalensis*, *Sophora flavescens* и *Elettaria cardamomum*, в отношении гуморального иммунного ответа мышей при азатиоприновой иммуносупрессии [2, 3].

Выводы

На основании проведенных исследований по выявлению иммуномодулирующей активности α -4,6-глюкана из *Phlomis tuberosa* (L.) Moench установлено, что полимер обладает способностью

восстанавливать показатели клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии, что позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения с целью создания лекарственных средств для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний, а также проводить целенаправленный поиск новых эффективных и малотоксичных иммунокорректирующих препаратов среди растительных видов сырья, содержащих, преимущественно, полисахариды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исламова Ж.И., Маликова М.Х., Хушбактова З.А. и др. Экспериментальная оценка иммуотропного действия арабиногалактана и пектиновых полисахаридов из ферулы кухистанской // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. Т. 79. № 6. С. 12–14.
2. Хобракова В.Б., Оленников Д.Н. Иммуномодулирующие свойства растительных глюканов при экспериментальной иммунодепрессии // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012. № 6. С. 103–105.
3. Хобракова В.Б., Шоболова А.Б., Оленников Д.Н. Влияние фракций, выделенных из софоры желтоватой, на антителообразование // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 3. Р. 275–277.
4. Li X.J., Bao W.R., Leung C.H., et al. Chemical Structure and Immunomodulating Activities of an α -Glucan Purified from *Lobelia chinensis* Lour // *Molecules*. 2016. № 21. Р. 779. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/779/htm>.
5. Vetvicka V., Vetvickova J. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts // *Ann. Transl. Med.* 2014. № 2. Р. 14. [Электронный ресурс]. URL: <http://atm.amegroups.com/article/view/3394/4245>.
6. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* on the humoral immune response // Proceedings of the 7th International Symposium on Mongolian Medicine and Natural Medicine Inner Mongolia (Tongliao) First Mongolian Medicine Industry Expo (2015, August, 20). Tongliao. 2015. Р. 475–478.
7. 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 // Proceedings of the 6th International Scientific Conference «Traditional Medicine: Ways of Integration with Modern Health Care» (2015. August 15–17). Ulan-Ude. 2013. Р. 97–98.
8. Круглая А.А., Муравьева Д.А., Борисенко И.А. Полисахаридный состав растений рода зопник // Фармация. 2007. № 6. С. 10–11.
9. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. М.: Медицина. 1985. 256 с.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Буянтяна и др. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
11. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibodyforming cells // *Nature*. 1965. V. 207. № 5001. Р. 1106–1107.

Поступила 25 ноября 2016 г.

IMMUNOMODULATORY ACTION OF α -4,6-GLUCAN FROM *PHLOMOIDES TUBEROSA* (L.) MOENCH TUBERS

© Authors, 2017

V.B. Khobrakova

Dr.Sc. (Biol.), Associate Professor, Senior Research Scientist, Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Ulan-Ude)
E-mail: val0808@mail.ru

D.Z. Tsyrenova

Post-Graduate Student, Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Ulan-Ude)
E-mail: dtsyrenova@mail.ru

D.N. Olennikov

Dr.Sc. (Pharm.), Leading Research Scientist, Laboratory of Medical and Biological Research, Institute of General and Experimental Biology SB RAS (Ulan-Ude)

The present study was aimed at the estimation of immune modulating properties of the α -4,6-glucan isolated from the tubers of *Phlomoidea tuberosa* (L.). Moench in the reactions of cellular, humoral and macrophage chains of the immune response using experimental azathioprin immunosuppression animal model.

The experiments were carried out on F1 (CBAx57B1/6) male mice, 18-20 g of weight. Immune deficiency was modeled by the intragastrical introduction of azathioprin in the dose 50 mg/kg once a day for 5 days. The experimental group of animals received the α -4,6-glucan once a day intragastrically in dose 1 mg/kg for 14 days against the background of azathioprin immunosuppression. The intact group received the purified water according to the analogous scheme.

The results have shown that the α -4,6-glucan restores the indices of reactions characterizing the main chains of immune system. The course administration of the α -4,6-glucan against the background of azathioprin was followed by the 1.5 times increase of the cell-mediated immune reaction of delayed-type hypersensitivity index as compared with the same one in the control group. The study of the tested polysaccharide influence on the state of the humoral immunity has established that the α -4,6-glucan increases the values of absolute and relative number of antibody-forming cells in 1.5 and 1.8 times as compared with the same ones in the control group. The study of the α -4,6-glucan influence on the state of the macrophage chain revealed increase of phagocytic activity of peritoneal macrophages; phagocytic index exceeded the control group level 1.5 times.

Thus, the data obtained allow to conclude that the α -4,6-glucan isolated from the tubers of *Phlomoidea tuberosa* has the marked immune modulating activity that substantiates the expediency of its further study in order to create new effective immune modulators.

Key words: *Phlomoidea tuberosa* (L.) Moench, immunomodulatory activity of polysaccharides, α -4,6-glucan, immunosuppression, azathioprine, delayed hypersensitivity, antibody-producing cells, phagocytosis.

References

1. Islamova Zh.I., Malikova M.H., Hushbaktova Z.A. i dr. Jeksperimental'naja ocenka immunotropnogo dejstviya arabinogalaktana i pektinovyh polisaharidov iz feruly kuhinstanskoj // Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija. 2016. T. 79. № 6. S. 12–14.
2. Hobraakova V.B., Olennikov D.N. Immunomodulirujushhie svojstva rastitel'nyh gljukanov pri jeksperimental'noj immunodepressii // Bjulleten' VSNC SO RAMN. 2012. № 6. S. 103–105.
3. Hobraakova V.B., Shobolova A.B., Olennikov D.N. Vlijanie frakcij, vydelennyh iz sofory zheltovatoj, na antiteloobrazovanie // Bjulleten' VSNC SO RAMN. 2010. № 3. R. 275–277.
4. Li X.J., Bao W.R., Leung C.H., et al. Chemical Structure and Immunomodulating Activities of an α -Glucan Purified from *Lobelia chinensis* Lour // Molecules. 2016. № 21. P. 779. [Jelektronnyj resurs]. URL: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/779/htm>.
5. Vetricka V., Vetrickova J. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts // Ann. Transl. Med. 2014. № 2. P. 14. [Jelektronnyj resurs]. URL: <http://atm.amegroups.com/article/view/3394/4245>.
6. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* on the humoral immune response // Proceedings of the 7th International Symposium on Mongolian Medicine and Natural Medicine Inner Mongolia (Tongliao) First Mongolian Medicine Industry Expo (2015, August, 20). Tongliao. 2015. P. 475–478.
7. Tsyrenova D.Z., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Phlomoidea tuberosa* (L.) Moench on the cellular chain of the immune response in experimental immunosuppression // Proceedings of the 6th International Scientific Conference «Traditional Medicine: Ways of Integration with Modern Health Care» (2015. August 15–17). Ulan-Ude. 2013. P. 97–98.
8. Kruglaja A.A., Murav'eva D.A., Borisenko I.A. Polisaharidnyj sostav rastenij roda zopnik // Farmacija. 2007. № 6. S. 10–11.
9. Lazareva D.N., Alehin E.K. Stimuljatory immuniteta. M.: Medicina. 1985. 256 s.
10. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskijh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja / Pod red. A.N. Mironova, N.D. Bunjatjana i dr. M.: Grif i K. 2012. 944 s.
11. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibodyforming cells // Nature. 1965. V. 207, № 5001. P. 1106–1107.