

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *PHLOMOIDES TUBEROSA* (L.) МОЕНШ НА СТРУКТУРУ СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ ПРИ ИММУНОСУПРЕССИИ

УДК 615.322
DOI: 10.17816/RCF15153-57

© Д.З. Цыренова¹, С.М. Гуляев¹, В.Б. Хобракова^{1,2}

¹ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ, Россия;

²ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», Улан-Удэ, Россия

Поступила в редакцию 13.01.2017

Принята к печати 02.03.2017

Ключевые слова:

иммунитет; иммуносупрессия; азатиоприн; экстракт *Phlomis tuberosa*; иммуномодулирующая активность; мыши; селезенка; морфология.

Резюме

Введение. Иммунная система чрезвычайно восприимчива к неблагоприятным внешним и внутренним факторам. В этой связи необходима коррекция иммунодепрессивных состояний иммунных органов с помощью комплексных и безопасных средств, таких как извлечения из лекарственных растений. Интерес в этом плане представляют растения, содержащие фенилпропаноиды. Ранее нами было показано, что экстракт из клубней зопника клубненосного (*Phlomis tuberosa* L. Moench) проявляет иммуностимулирующую активность благодаря содержанию фенилпропаноидов. **Цель** настоящего исследования — оценить влияние экстракта *P. tuberosa* на структуру селезенки при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии. **Материалы и методы.** Эксперименты были проведены на мышах-самцах линии СВА массой 20–22 г. Иммунодефицит был смоделирован внутрижелудочным введением азатиоприна в дозе 50 мг/кг однократно в течение 5 дней. Экспериментальная группа животных получала исследуемый

экстракт 1 раз в сутки внутрижелудочно в дозе 1 мг/кг в течение 14 дней на фоне азатиоприновой иммуносупрессии. Интактная группа получала очищенную воду в соответствии с аналогичной схемой. Данные были получены с использованием гистологического, морфометрического и статистического анализа. **Результаты.** Установлено, что азатиоприн вызывал деструктивные изменения структуры лимфоидной ткани селезенки: площадь белой пульпы и толщина периартериальной лимфоидной муфты (ПАЛМ) были одинаково меньше — в 1,7 раза, диаметры лимфоидных узелков и герминативных центров были меньше соответственно в 2,6 и 1,7 раза по сравнению с негативным контролем. Введение животным исследуемого средства достоверно ограничивало развитие супрессивного действия цитостатика азатиоприна: площадь белой пульпы и толщина ПАЛМ селезенки мышей, получавших экстракт, были в 1,5 и 1,4 раза больше, диаметры лимфоидных узелков и герминативных центров были в 2,1 и 1,2 раза больше позитивного контроля. **Заключение.** Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сухой экстракт *P. tuberosa* обладает выраженной иммуномодулирующей активностью, что обосновывает целесообразность его дальнейшего исследования с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

THE INFLUENCE OF *PHLOMOIDES TUBEROSA* EXTRACT ON STRUCTURE OF SPLEEN IN IMMUNOSUPPRESSIVE MICE

© D.Z. Tsyrenova¹, S.M. Gulyaev¹, V.B. Khobrakova^{1,2}

¹Institute of General and Experimental Biology of SB RAS, Ulan-Ude, Russia;

²Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

For citation: Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, 2017;15(1):53-57

Received: 13.01.2017

Accepted: 02.03.2017

◆ **Keywords:** immunity; immunosuppression; azathioprine; *Phlomis tuberosa* extract; immunomodulating activity; mice; spleen; morphology.

◆ **Abstract. Background.** The immune system is extremely sensitive to adverse external and internal factors. In this context, a correction of immunosuppressive states of immune organs by means of complex and safe means, such as the extraction of medicinal plants is required. In this regard,

plants containing phenylpropanoids are of interest. It was shown that the extract from *Phlomis tuberosa* L. Moench showed immunostimulatory activity due to the content phenylpropanoids. **Purpose.** The present study was aimed at the estimation of the effect of *P. tuberosa* extract on the spleen structure using experimental azathioprine immunosuppression model. **Materials and methods.** The experiments were carried out on CBA male mice, 20-22 g of weight. 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 received the tested remedy once a day intragastrically in dose 1 mg/kg for 14 days against the background of azathioprine immunosuppression. The intact group received the purified water according to the analogous scheme. Data were obtained using histological, morphometric and statistical analysis. **Results.** The results have shown that azathioprine caused disruptive changes in the structure of the lymphoid tissue of the spleen: area of white pulp and the thickness of the periarterial lymphoid sheath (PALS) were equally less – in 1.7 times, the diameters

of the lymphoid nodules and germinative centers were lower, respectively in 2.6 and 1.7 times, compared with a negative control. The course administration of the test remedy to animals was significantly reduced suppressive effect of cytostatic azathioprine: area of white pulp and the thickness PALS spleens of mice treated with the extract were 1.5 and 1.4 times the diameters of lymphoid nodules and germinative centers was 2.1 times and 1.2 times more positive control. **Conclusion.** Thus, the data obtained allow to conclude that the dry extract *P. tuberosa* has the marked immune modulating activity that substantiates the expediency of its further study in order to create new effective immune modulators.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система чрезвычайно восприимчива к неблагоприятным внешним и внутренним факторам, а также ко многим лекарственным средствам [9]. Так, цитостатическая терапия злокачественных новообразований, аутоиммунных заболеваний, после трансплантации нередко приводит к дисфункции иммунной системы. В этой связи необходима коррекция иммунодепрессивных состояний тимуса и селезенки с помощью комплексных и безопасных средств. Такими средствами вполне могут служить извлечения из лекарственных растений. Они содержат, как правило, целый ряд биологически активных веществ, способных оказывать лечебное и восстановительное воздействие на организм, в частности органы иммунной системы [14]. Интерес в этом плане представляют растения, содержащие фенолпропаноиды. Они обладают широким спектром фармакологических свойств, в том числе иммуномодулирующей активностью [5]. Так, извлечения из зопника клубненосного (*Phlomis tuberosa*) применяют в традиционной медицине как ранозаживляющее и общеукрепляющее средства [10]. Показано, что экстракт из клубней данного растения проявляет иммуностимулирующую активность благодаря содержанию фенолпропаноидов [2, 11]. Однако влияние экстракта *Phlomis tuberosa* на структуру селезенки при иммуносупрессии не изучено.

Целью настоящего исследования явилось определение влияния сухого экстракта *Phlomis tuberosa* на структуру селезенки мышей при иммуносупрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на мышцах-самцах линии СВА массой 20–22 г (питомник РМН «Столбовая») в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лаборатор-

ной практики» (19.06.2003). Протокол исследований был согласован с локальным этическим комитетом Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (протокол № 2 от 05.09.2013).

Животные были распределены на три группы: 1) интактные мыши, 2) мыши с иммуносупрессией — контрольная группа (азатиоприн), 3) мыши с иммуносупрессией, получавшие экстракт *P. tuberosa* в дозе 200 мг/кг внутрижелудочно однократно в течение 14 дней — опытная группа. Животные 1-й и 2-й групп получали воду, очищенную по аналогичной схеме. Иммуносупрессивное состояние у животных 2-й и 3-й групп вызывали путем введения азатиоприна в дозе 50 мг/кг внутрижелудочно однократно в течение 5 дней [6]. На 20-е сутки животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом, извлекали селезенку и помещали в 10 % раствор нейтрального формалина. Фиксированные образцы после гистологической обработки заливали в парафин [8]. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические исследования проводили с помощью световой микроскопии (микроскоп Motic), морфометрию — с помощью программного обеспечения Motic Images, 2000: определяли относительную площадь белой пульпы, толщину периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ), средние диаметры лимфатических узелков (ЛУ) и герминативных центров [1].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании селезенки мышей, получавших азатиоприн, обнаружены выраженные структурные изменения: ПАЛМ были ассимметричной формы и неравномерной толщины; ЛУ принимали тоже неправильную форму (рис. 1, б).

При морфометрическом анализе выявлено уменьшение объема лимфоидной ткани в белой

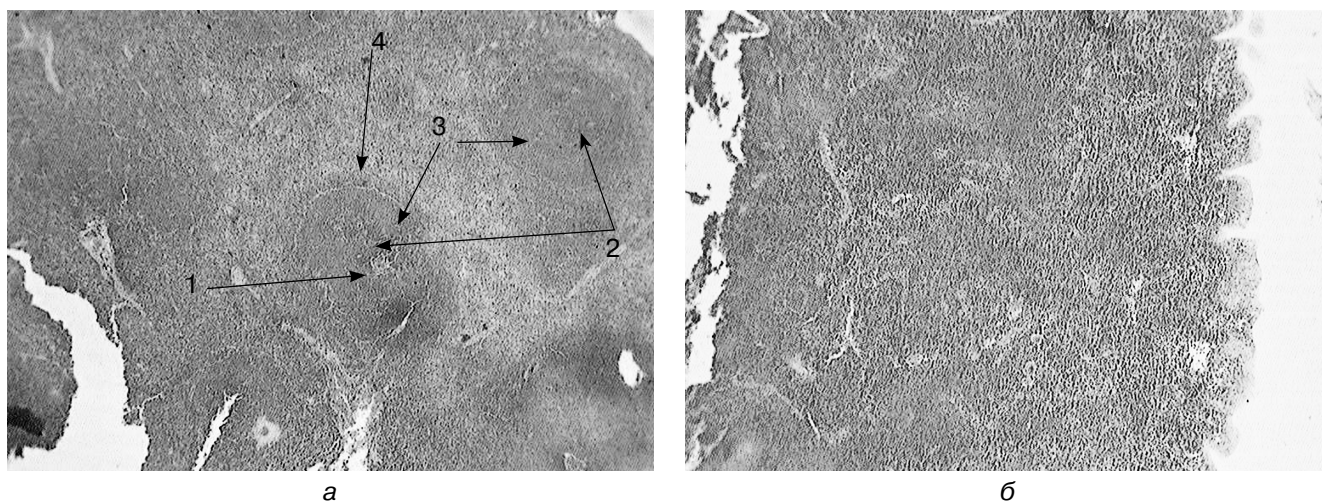


Рис. 1. Селезенка мыши: *a* — интактная группа (фолликулярная артерия — 1, герминативный центр — 2, мантийная зона — 3, маргинальная зона — 4); *б* — контрольная группа (азатиоприн), неравномерные по толщине периартериальные лимфоидные муфты, асимметричные лимфоидные узелки. Увеличение $\times 100$. Окраска гематоксилином и эозином

■ **Таблица 1. Влияние экстракта *Phlomis tuberosa* на структуру селезенки мышей при азатиоприновой иммуносупрессии ($M \pm m$), $n = 10$**

Группы животных	Площадь белой пульпы, %	Толщина периартериальной лимфоидной муфты, мкм	Диаметр лимфоидных узелков, мкм	Диаметр герминативных центров, мкм
Интактная	18,3 \pm 1,2	65,7 \pm 3,2	238,3 \pm 18,8	76,41 \pm 5,9
Контрольная (азатиоприн)	11,0 \pm 0,9*	44,8 \pm 2,6*	92,4 \pm 4,8*	45,3 \pm 2,1*
Опытная (азатиоприн + экстракт <i>P. tuberosa</i>)	16,5 \pm 1,2**	62,3 \pm 3,7**	194,0 \pm 12,3**	53,9 \pm 3,8

Примечание. Различия достоверны по сравнению с показателями: * интактной группы, ** контрольной группы, $p < 0,05$

пульпе: площадь и толщина ПАЛМ были одинаково меньше — в 1,7 раза, средние диаметры лимфоидных узелков и герминативных центров были меньше соответственно в 2,6 и 1,7 раза по сравнению с таковыми интактной группы (табл. 1).

Введение животным экстракта *P. tuberosa* после иммуносупрессии азатиоприном восстанавливало лимфоидные структуры селезенки: в лимфоидных узелках обнаруживали центры размножения (рис. 2). Площадь белой пульпы и толщина ПАЛМ селезенки мышей, получавших экстракт, были в 1,5 и 1,4 раза больше, диаметры лимфоидных узелков и герминативных центров были в 2,1 и 1,2 раза больше таковых в контрольной группе.

Введение животным азатиоприна приводит к гипоплазии белой пульпы селезенки в результате усиления свободнорадикальных реакций, процессов апоптоза лимфоцитов, снижения уровня пролиферативной активности [3]. Наши данные по влиянию азатиоприна на морфофункциональное состояние селезенки согласуются с данными в работе В.Л. Лимонова и др. (2005), в которой показано снижение массы органа и процента фолликулов белой пульпы с герминативными центрами [7]. В результате проведенных исследований установлено, что введение экстракта *P. tuberosa* ограничивало иммуносупрессивное воздействие азатиоприна, сохра-

няло пролиферативную лимфоидную активность селезенки. Иммуномодулирующий эффект экстракта *P. tuberosa* обусловлен антиоксидантной, иммуностропной активностью фенилпропаноидов при азатиоприновой иммуносупрессии [4, 13, 15]. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования А.Р. Шевцова и др. (2006), в котором показано восстановление морфофункционального состояния селезенки при экспериментальном син-

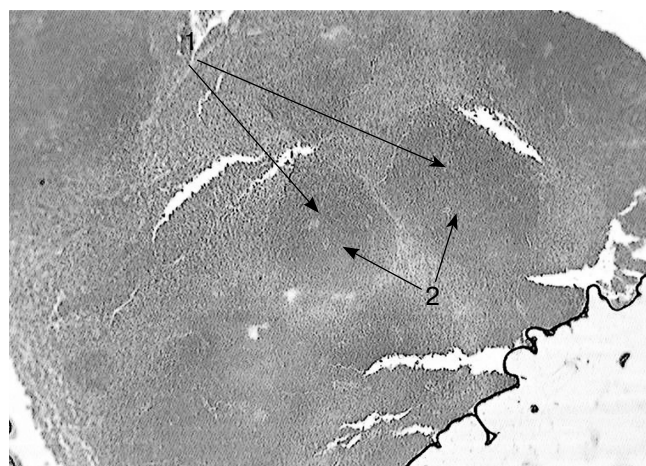


Рис. 2. Селезенка мыши, получавшей экстракт *P. tuberosa*: герминативный центр — 1, мантийная зона — 2. Увеличение $\times 100$. Окраска гематоксилином и эозином

дроме длительного сдавления на фоне применения полифенолов манжетки обыкновенной (*Alchimilla vulgaris* L.) [12].

ВЫВОДЫ

1. Введение мышам азатиоприна вызывает иммунодепрессивное воздействие на структуру селезенки, заключающееся в снижении уровня пролиферативной активности и уменьшении массы лимфоидных структур органа.
2. Экстракт *P. tuberosa* ограничивает иммунодепрессивное влияние азатиоприна: стимулирует пролиферативную активность селезенки, восстанавливает нормальную структуру ее лимфоидных компонентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: учебное пособие. – М.: Медицина, 2002. [Bases of quantitative pathological anatomy: a textbook. Moscow: Meditsina; 2002. (In Russ.)]
2. Гуляев С.М., Цыренова Д.З., Хобракова В.Б. Влияние *Phlomis tuberosa* на структуру тимуса мышей при иммуносупрессии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 12. – С. 41–44. [Gulyaev SM, Tsyrenova DZ, Khobrakova VB. The influence of *Phlomis tuberosa* extract on morphofunctional state of thymus in immunosuppressive mice. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2016;(12):41-44. (In Russ.)]
3. Кашченко С.А., Золотаревская М.В. Изменения морфометрических показателей белой пульпы селезенки крыс под воздействием иммуномодулирующих препаратов // Укр. мед. альм. – 2011. – Т. 14. – № 5. – С. 74–77. [Kashchenko SA, Zolotarevskaya MV. The changes of morphometric indexes of white pulp of rats' spleen under influence of immunomodulate drugs. *Ukr med al'm*. 2011;14(5):74-77. (In Russ.)]
4. Куркин В.А., Авдеева Е.В., Суворова А.В., Дубищев А.В. Актуальные проблемы и перспективы развития фитотерапии и фитотерапии // Мед. альманах. – 2008. – № 4. – С. 41–44. [Kurkin VA, Avdeeva EV, Suvorova AV, Dubishchev AV. Acute problems and development prospects of phytopharmacology and phytotherapy. *Med. al'manakh*. 2008;(4):41-44. (In Russ.)]
5. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Ежков В.Н. Фенилпропаноиды лекарственных растений. – Самара: Офорт, 2005. [Kurkin VA, Zapesochnaya GG, Ezhkov VN. Phenylpropanoids from medicinal plants. Samara: Ofort; 2005. (In Russ.)]
6. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. – М.: Медицина; 1985. [Lazareva DN, Alekhin EK. Immune stimulants. Moscow: Meditsina; 1985. (In Russ.)]
7. Лимонов В.Л., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В., и др. Морфологическое исследование почек и селезенки у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом, интактных и на фоне иммуносупрессивной терапии // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – № 2. – С. 50–54. [Limonov VL, Shurlygina AV, Robinson MV, et al. Morphological research of the kidneys and spleen in mice with immune complex glomerulonephritis, intact and in immunosuppression therapy. *Bulleten' SO RAMN*. 2005;(2):50-54. (In Russ.)]
8. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. [Merkulov GA. Course of pathologic-histological technology. Leningrad: Meditsina; 1969. (In Russ.)]
9. Сепиашвили Р.И. От иммунотерапии к персонализированной таргетной иммуномодулирующей терапии и иммунореабилитации // Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16. – № 4. – С. 323–327. [Sepiashvili RI. From immunotherapy to personalized targeted immunomodulating therapy and immunorehabilitation. *Allergologiya i immunologiya*. 2015;16(4):323-327. (In Russ.)]
10. Хайдав Ц., Меньшикова Т.А. Лекарственные растения в монгольской медицине: Историко-медицинские исследования. – Улаанбаатар, 1985. [Khaydav Ts, Men'shikova TA. Medicinal plants in Mongolia: historical and medical research. Ulaanbaatar; 1985. (In Russ.)]
11. Цыренова Д.З., Хобракова В.Б. Влияние сухого экстракта зопника клубненосного на фагоцитарную активность макрофагов при экспериментальной иммуносупрессии: Материалы международного форума «Клиническая иммунология и аллергология — междисциплинарные проблемы». – Казань, 2014. – С. 276–277. [Tsyrenova DZ, Khobrakova VB. The influence of the dry extract from *Phlomis tuberosa* (L.) Moench on the phagocytic activity of macrophages in experimental immunosuppression. (Conference proceedings) Materialy mezhdunarodnogo foruma "Klinicheskaya immunologiya i allergologiya – mezhdistsiplinarnye problem". Kazan'; 2014. P. 276-277. (In Russ.)]
12. Шевцов А.Р., Головнёв В.А., Голубева И.А. Морфология селезенки в норме, при моделировании синдрома длительного сдавления и в условиях применения полифенолов манжетки обыкновенной // Вестник НГУ. Серия «Биология, клиническая медицина». – 2006. – Т. 4. – № 3. – С. 62–65. [Shevtsov AR, Golovnev VA, Golubeva IA. The spleen morphology in normal state, during modelling of compression syndrome and under application of *Alchemilla vulgaris* polyphenols. *Vestnik NGU. Seriya «Biologiya, klinicheskaya meditsina»*. 2006;4(3):62-5. (In Russ.)]
13. Ahmad W, Jantan I, Kumolosasi E, Abbas Bukhari SN. Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:2961-73.
14. Sultan MT, Butt MS, Qayyum MM, Suleria HA. Immunity: plants as effective mediators. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(10):1298-308. doi: 10.1080/10408398.2011.633249.

15. Harmatha J, Zidek Z, Kmonickova E, Smidrkal J. Immunobiological properties of selected natural and chemi-

cally modified phenylpropanoids. *Interdisc Toxicol.* 2011;4(1):5-10. doi: 10.2478/v10102-011-0002-1.

◆ Информация об авторах

Дарима Золтоевна Цыренова — аспирант лаборатории экспериментальной фармакологии. ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. E-mail: dtsyrenova@mail.ru.

Сергей Миронович Гуляев — канд. мед. наук, старший науч. сотр. лаборатории экспериментальной фармакологии. ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. E-mail: s-gulyaev@inbox.ru.

Валентина Бимбаевна Хобракова — д-р биол. наук, доцент, старший науч. сотр. лаборатории экспериментальной фармакологии. ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ. E-mail: val0808@mail.ru.

◆ Information about the authors

Darima Z. Tsyrenova — post-graduate student, Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia. E-mail: dtsyrenova@mail.ru.

Sergey M. Gulyaev — PhD, Senior staff scientist, Laboratory of Safety of Biologically Active Substances, Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia. E-mail: s-gulyaev@inbox.ru.

Valentina B. Khobrakova — Dr, Senior staff scientist, Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia. E-mail: val0808@mail.ru.