

**ДУТОВА Светлана Вячеславовна**

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ИММУНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ СЫРЬЯ  
ЭФИРНОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ**

14.03.06 фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации

на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Волгоград – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Хакасский государственный университет имени Н. Ф. Катанова»

**Научный консультант:** – доктор медицинских наук, профессор  
**Карпова Мария Ростиславовна**

**Официальные оппоненты:**

**Манвелян Элеонора Аслибековна**, доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Кавказский федеральный университет», профессор кафедры медицинской биохимии, клинической лабораторной диагностики и фармации.

**Крикова Анна Вячеславовна**, доктор фармацевтических наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Смоленский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой управления и экономики фармации.

**Шабанов Петр Дмитриевич**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии.

**Ведущее учреждение:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016г.

Ученый секретарь Диссертационного  
Совета, доктор биологический наук

Любовь Ивановна Бугаева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Большой проблемой практической медицины является увеличение числа заболеваний, в основе которых лежат иммунопатологические процессы (Тузанкина И.А., 2010; Зверков И.В. и др., 2011; Добров А.В. и др., 2012; Дунаевская С.С., 2013). От состояния иммунной системы зависят, в частности, возможность и последствия заражения организма человека возбудителями инфекционных заболеваний. Нарушения в иммунном ответе обычно способствуют хронизации инфекционного процесса и развитию осложнений (Чеботарева Т.А. и др., 2010; Есимова И.Е. и др., 2012; Голубев А.О., Милютин Л.Н., 2013; Капустина Т.А. и др., 2013; Белобородова Е.В. и др., 2014; Набиева У.П., 2014). К тому же, с каждым годом увеличивается число резистентных к противомикробной терапии штаммов микроорганизмов (Зузов С.А. и др., 2009; Сабирова Е.В. и др., 2010; Саблин О.А. и др., 2012; Юревич М.А., 2012; Гординская Н.А. и др., 2013; Леженко Г.А. и др., 2013).

Все эти аспекты диктуют необходимость использования иммуностимулирующих лекарственных средств (ЛС), что позволяет сдерживать распространение множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов и добиваться излечения пациентов с недостаточностью иммунного ответа (Кошеров Б.Н. и др., 2009; Балыкова Л.А., 2010; Будрицкий А.М., Кучко И.В., 2010; Сакович Г.С. и др., 2010; Зайков С.В. и др., 2013; Караулов А.В., Калюжин О.В., 2013; Ревякина В.А., 2013; Булгакова В.А., 2014; Савенкова М.С., 2014).

С другой стороны, первостепенной задачей отечественной фармакологии является разработка инновационных ЛС, конкурентноспособных с производимыми за рубежом (Куркин В.А., 2012; Петров В.И., 2012; Хабилова С.Х., 2013). Несмотря на обилие иммуностимуляторов и иммунокорректоров на фармацевтическом рынке Российской Федерации, большинство из них является импортными (Вельмайкина Е.И., 2012; Куркин В.А., 2012; Реестр лекарственных средств. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>). Таким образом, разработка отечественных иммуностимулирующих ЛС является актуальной задачей.

Одним из основных источников новых ЛС на современном этапе остаются соединения природного происхождения, большей частью растительного (Салахутдинов Н.Ф., 2009; Абышев А.З. и др., 2013; Гуреев М.А. и др., 2014;

Дикусар Е.А. и др., 2014). Особый интерес представляют биологически активные соединения (БАС) растительного происхождения, фармакологическая эффективность которых сочетала бы в себе как благоприятное воздействие на иммунную систему организма, так и ингибирующее воздействие на инфекционный агент (вирусы, патогенные бактерии, грибы).

### **Степень разработанности проблемы**

Иммуотропных ЛС растительного происхождения, официально используемых в практической медицине в нашей стране, в настоящее время немного, более 80 % из них производят из сырья эхинацеи пурпурной (Вельмяйкина Е.И., 2012; Реестр лекарственных средств. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>). Кроме них в РФ зарегистрирован только фитопрепарат «Тонзилгон», выпускаемый в Германии из сырья 9 официальных лекарственных растений (Коваленко Л.П. и др., 2008).

В последние годы проводятся доклинические исследования других источников БАС с иммуотропным действием среди неофициальных растений флоры Сибири и Забайкалья (Данилец М.Г., 2010; Хобракова В.Б. и др., 2010; Хобракова В.Б., Архипова Э.В., 2011; Хобракова В.Б., 2012). Также, изучается иммуностимулирующее действие лекарственных растений (ЛР), уже используемых в практической медицине и ЛР, содержащих фенилпропаноиды (Исайкина Н.В. и др., 2008; Куркин В.А., Авдеева Е.В., 2009; Куркин В.А., 2012; Масная Н.В. и др., 2013). Активно исследуются иммуностимулирующие свойства дикорастущих и культивируемых растений зарубежными учеными (Makhija I.K. et al., 2011; Jiang W. et al., 2012; Nobakht A. et al., 2012; Egba S.I. et al., 2013; Karami B. et al., 2013; Park H.J. et al., 2014).

Несмотря на появляющиеся литературные сведения о наличии иммуностимулирующих свойств многих растений, степень научной разработанности проблемы введения в практическую медицину лекарственных препаратов (ЛП) на их основе остается невысокой. Это связано с определенными трудностями в изучении механизмов действия, стандартизации комплексов БАС растительного происхождения, контроле качества лекарственных форм из растительного сырья. И проблема расширения ассортимента иммуотропных фитопрепаратов остается нерешенной.

В процессе поиска новых растительных источников ЛС важным этапом является изучение фармакологической активности и химического состава лекарственного растительного сырья (ЛРС) из арсенала народной и традиционной медицины. В этом плане большой интерес представляет народная медицина коренных жителей Южной Сибири, на которую огромное влияние оказали традиционные системы врачевания, сложившиеся в Монголии, Китае, на Тибете. Перспективно исследование эфирномасличных растений (ЭМР), накапливающих в качестве компонентов эфирных масел (ЭМ) соединения ароматического характера с выраженными противомикробными свойствами (тимол, цинеол, эвгенол и др.). Доклинические фармакологические исследования БАС большинства из них не проведены, сведения о химическом составе незначительны.

Считаем целесообразным изучение иммуностропных и противомикробных свойств 6 неофициальных видов ЭМР семейств *Lamiaceae* и *Rosaceae*, широко применяющихся в традиционной и народной медицине различных стран. Для БАС *Schizonepeta multiphida* (L.) Brig. (ЭМ), *Ziziphora clinopodioides* Lam. (ЭМ, метанольный экстракт); *Nepeta sibirica* L. (ЭМ, этанольный экстракт), *Prunella vulgaris* L. (настойка, настой, эфирный экстракт) установлена противомикробная активность (Делова Г.В., Гуськова И.Н., 1994; Sonboli A. et al., 2006; Beikmohammadi M., 2011; Shahla S.N. et al., 2012; Anzabi Y. et al., 2013; Rasool R., Ganai B.A., 2013). Экстракты и индивидуальные БАС *P. vulgaris* обладают иммуностропным действием (Psotova J. et al., 2003; Fang X. et al., 2005; Harput, U.S. et al., 2006; Cheng Ch-L., Xu H., 2010). Сведения о биологической и фармакологической активности БАС *Thymus petraeus* Serg. и *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb.) отсутствуют.

### **Цель исследования**

Провести доклиническое исследование иммуностропного действия суммарных извлечений из сырья эфирномасличных растений для разработки на их основе эффективной и безопасной фармацевтической субстанции, изучить механизмы ее действия.

### **Задачи исследования**

1) провести скрининг иммуностропной и противомикробной активности извлечений из сырья шести не используемых в медицинской практике

эфирномасличных растений (*Nepeta sibirica* L., *Schizonepeta multiphida* (L.) Brig., *Ziziphora clinopodioides* Lam., *Prunella vulgaris* L., *Thymus petraeus* Serg., *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb.), содержащих в составе эфирного масла соединения ароматической структуры;

2) провести доклиническое исследование иммуотропного действия наиболее активных извлечений, разработать фармацевтическую субстанцию, изучить механизм ее действия;

3) изучить протективное действие разработанной фармацевтической субстанции при экспериментальной стафилококковой инфекции;

4) провести оценку безопасности разработанной фармацевтической субстанции по показателям острой и хронической токсичности;

5) изучить химический состав и ресурсный потенциал лекарственного растительного сырья – источника фармацевтической субстанции с иммуотропным и противомикробным действием.

**Научная новизна исследования.** Впервые изучены иммуностимулирующие, иммунокорригирующие и противомикробные свойства комплексов БАС эфирномасличных растений, не используемых в медицинской практике.

Впервые получена фармацевтическая субстанция (ФС) с иммуностимулирующим, иммунокорригирующим и противомикробным действием из сырья *C. geoides* (*Rosaceae*). Впервые проведено изучение ее фармакологического действия в сравнении с официальным иммуностимулятором растительного происхождения (настойкой эхинацеи), в том числе на модели иммунодефицита. Впервые описан возможный механизм иммуотропного действия разработанной ФС.

Впервые изучена острая и хроническая токсичность ФС из сырья *C. geoides* с использованием предполагаемого пути введения и учетом половых различий. Установлено, что разработанная ФС согласно классификации И. В. Санюцкого (1970) относится к классу малотоксичных.

Впервые установлен химический состав фенольных соединений ЛРС и суммарных извлечений из сырья *C. geoides*, выявлен комплекс действующих

веществ. Полученные данные о качественном составе фенольных соединений *C. geoides* могут быть использованы в целях хемосистематики.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В результате исследований получены новые данные о иммуотропном действии суммарных извлечений из сырья ЭМР, не используемых в медицинской практике.

Установлено иммуностимулирующее действие БАС *C. geoides* в отношении фагоцитарной активности нейтрофилов, гуморального иммунного ответа, клеточного иммунного ответа, синтеза иммуноглобулинов, цитокинпродуцирующей активности лейкоцитов; а также иммунокорригирующее действие на фагоцитарную активность нейтрофилов, пролиферацию антителообразующих клеток в процессе формирования первичного гуморального иммунного ответа на фоне экспериментального иммунодефицита.

Описан возможный механизм иммуотропного действия БАС *C. geoides*.

Результаты исследований могут быть использованы при разработке новых иммуностимулирующих и иммуномодулирующих ЛС.

Подготовлен проект Временной фармакопейной статьи на ЛРС «Колюрии гравилатовидной корневище с корнями и трава».

Подготовлен отчет о результатах доклинического исследования разработанной ФС для медицинского применения, содержащий описание, результаты и статистический анализ результатов.

Издана монография «Лекарственные растения Хакасии», рекомендованная для использования в учебном процессе.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальной медицины и гигиены ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова» в рамках дисциплин «Микробиология, вирусология», «Иммунология», «Фармакология»; используются в лекционном курсе, при проведении лабораторных работ и в научно-исследовательской работе студентов специальности «Лечебное дело», аспирантов.

## **Методология и методы исследования**

Методологической основой явились работы отечественных и зарубежных ученых в области иммунофармакологии, токсикологии, фитохимии, популяционной биологии растений. Исследования планировали и проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению иммуотропной активности лекарственных средств (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, 2012. С. 624-639, 509-521) с использованием современных методов. Исследования осуществляли на половозрелых неинбредных и инбредных мышах, а также на культурах мононуклеаров. Все исследования были одобрены Региональным этическим комитетом, протокол № 1 от 10.10.2012г.

Иммуотропные эффекты извлечений оценивали в сравнении с официальным иммуностимулятором и иммунокорректором растительного происхождения – настойкой эхинацеи пурпурной. Для изучения иммунокорректирующего действия извлечений была использована классическая модель экспериментального иммунодефицита (введение иммунодепрессанта циклофосфана) и экспериментальной генерализованной стафилококковой инфекции.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Среди изученных эфирномасличных растений семейств *Lamiaceae* и *Rosaceae*, содержащих ароматические соединения, в качестве источника лекарственных средств с иммуотропными и противомикробными свойствами наиболее перспективным является *Coluria geoides* (*Rosaceae*).
2. Извлечения из сырья *C. geoides* превосходят настойку эхинацеи (официальный иммуотропный препарат) по иммуностимулирующему действию (направленному на продукцию провоспалительных цитокинов и синтез иммуноглобулинов) и по иммунокорректирующему действию (направленному на пролиферацию антителообразующих клеток селезенки и синтез иммуноглобулинов).
3. Комплекс биологически активных соединений, извлекаемый из сырья *C. geoides* 40 %-ным спиртом этиловым, рекомендуется в качестве фармацевтической субстанции для создания лекарственных препаратов с



иммуностимулирующим, иммунокорригирующим и противомикробным действием. Возможным механизмом иммуотропного действия фармацевтической субстанции является стимуляция синтеза провоспалительных цитокинов и пролиферации иммунокомпетентных клеток.

4. Разработанная фармацевтическая субстанция из сырья *C. geoides* обладает протективным действием при генерализованной стафилококковой инфекции и является малотоксичной, перспективным является ее использование для лечения и профилактики гнойно-воспалительных инфекций, вызванных грамположительными микроорганизмами.
5. Действующими веществами, обуславливающими иммуностимулирующие и иммунокорригирующие свойства разработанной фармацевтической субстанции из сырья *C. geoides*, являются простые фенилпропаноиды (фенилпропаны и производные коричных кислот).
6. *C. geoides* в природных условиях Республики Хакасия является ресурсным видом, на других территориях РФ может культивироваться.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на неинбредных и инбредных половозрелых мышах с использованием современных методов и методических подходов, современного оборудования и ЛПП сравнения в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению иммуотропного и противомикробного действия лекарственных средств (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012. С. 624-639, С. 509-521), а также параметрических и непараметрических критериев статистической обработки данных.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на Шестой и Седьмой Всероссийских научно-практических конференциях «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2013; 2015); Всероссийской научно-практической конференции "Дни иммунологии в Сибири" (Красноярск, 2011; Абакан, 20012; Кызыл, 2013), Всероссийской конференции с международным участием

«Доклинические исследования в инновационной медицине и биотехнологиях» (Самара, 2013), Международной научно-практической конференции «Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации» (Орехово-Зуево, 2014), XXI Всероссийском конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014); Всероссийской научной интернет-конференции с международным участием «Фармакологическая наука – от теории к практике» (Казань, 2015).

По теме диссертации опубликовано 56 работ, в том числе 17 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 монография. Первичная экспертиза работы проведена на расширенном заседании кафедры фундаментальной медицины и гигиены ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова».

#### **Связь работы с научными программами и планами**

Данная работа выполнена в рамках приоритетного направления научных исследований ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова» «Медико-психолого-социальные технологии снижения потерь от распространенных и социально значимых заболеваний» (Перечень приоритетных направлений утвержден на заседании Ученого совета ХГУ 31.10.2013г., протокол № 5).

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 304 страницах машинописного текста, иллюстрирована 76 таблицами, 43 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2-6), обсуждения результатов (глава 7), выводов, практических рекомендаций и приложения. Список литературы включает 312 отечественных и 95 иностранных источников.

#### **Личный вклад автора**

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах работы: планировании и проведении экспериментальных исследований; обработке, интерпретации и обсуждении полученных результатов; выполнении статистической обработки результатов, подготовке публикаций по основным положениям диссертационной работы, сборе и анализе литературных данных, оформлении рукописи диссертации. Участие автора в фитохимических исследованиях 50%.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен литературный обзор работ, отражающих современные взгляды на возможность использования ЭМ и ЭМР в медицинской практике. В первой части обзора приводятся данные о современном ассортименте и возможности разработок иммуностропных ЛС растительного происхождения, а также о классификации и фармакологической активности ЭМ, компонентов ЭМ ароматической структуры и фенилпропаноидов. Во второй части обзора приводится анализ данных о ЭМР флоры Республики Хакасия.

В **главе 2** представлены этапы и объекты исследования, описаны материалы и методы. Работа выполнена на кафедре фундаментальной медицины и гигиены ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова» (ректор, д.э.н., профессор Т. Г. Краснова; заведующая кафедрой д.м.н, доцент Е. С. Агеева). Исследование проведено **в 4 этапа**:

1. скрининг иммуностропной и противомикробной активности извлечений из сырья ЭМР, предварительный фитохимический анализ;
2. исследование иммуностропной активности наиболее эффективного извлечения, разработка ФС;
3. изучение безопасности разработанной ФС и возможности использования при инфекционном заболевании;
4. изучение биологических особенностей и химического состава ЭМР – источника ФС, выявление действующих веществ.

**Объектами исследования** явились 6 видов ЭМР из семейств *Lamiaceae* и *Rosaceae*, отобранные на основании сведений о распространении, химическом составе, использовании в традиционной и народной медицине: *Nepeta sibirica* (Ns), *Schizonepeta multiphida* (Sm), *Ziziphora clinopodioides* (Zc), *Prunella vulgaris* (Pv), *Thymus petraeus* (Tp), *Coluria geoides* (Cg). Этаноловые извлечения (настойки) получали в асептических условиях методом перколяции 1:5 (ГФ XI изд., Вып. 2. 1990. С.289) 40 %-ным (извлечения из сырья 6 видов исследуемых ЭМР) и 70 %-ным (извлечение С-2 из сырья Cg) спиртом этиловым. Извлечения выпаривали досуха, стандартизовали по выходу экстрактивных веществ (извлечения из сырья Cg дополнительно – по содержанию m-кумаровой кислоты). С целью выявления действующих веществ получали фракции извлечения С-1: 28,3 г высушенного

извлечения растворяли в 200 мл воды и фракционировали рядом растворителей с увеличивающейся полярностью (хлороформ, ацетон, бутанол-1, этанол). Изучали иммуностропные свойства и двух фракций (этаноловой и водной), которые имели наибольший выход БАС (45,7 % и 51,3 % соответственно). Перед экспериментом извлечения и фракции суспендировали в воде очищенной. Доза извлечений в экспериментах *in vivo* 50 мг/кг (вводили животным через зонд в желудок 1 раз в день в течение 5 дне); *in vitro* – 10 мкг/мл питательной среды.

В качестве ЛП сравнения использовали настойку эхинацеи пурпурной (ООО «Ватхэм-Фармация», г. Рязань, рег. № ЛСР-007043/09). Для изучения противомикробной активности получали также водные извлечения и ЭМ (ГФ СССР. XI изд. Вып. 1. 1987. С.290; ГФ XI изд., Вып. 2. 1990. С.148-149). В процессе получения ЭМ собирали отгонные воды. В качестве ЛП сравнения использовали ЭМ, водное и этаноловое извлечения из травы душицы обыкновенной (*Origanum herba*) и корневища аира болотного (*Calami rhizomata*), полученные аналогичным способом.

Сбор материала и описание растительных сообществ с участием *C. geoides* проводили на территории пяти административных районов Республики Хакасия. Для оценки состояния особей *C. geoides* в природных условиях, описания онтогенетических, экологических и популяционных особенностей было обследовано 20 ценопопуляций (ЦП), ресурсные характеристики *C. geoides* определяли в пределах 9 ЦП. Выход ЭМ и содержание суммы фенолкарбоновых кислот в сырье *C. geoides* определяли в образцах сырья, собранных в пределах 5 ЦП и в условиях интродукции (питомник лекарственных и декоративных растений ГНУ НИИ аграрных проблем Хакасии РАСН).

**Материалы исследования.** Фармакологические исследования проводили на лабораторных животных: 320 неинбредных мышах обоего пола и 921 инбредных мышах обоего пола и самках линии СВА/СаЛас (получены из отдела экспериментального биомедицинского моделирования ФГБУ «НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга» СО РАМН, Томск). Исследования проводили с соблюдением правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 51000.3-96 и ГОСТ Р 51000.4-96), Международных рекомендаций «Европейской конвенции ...» (Strasburg, 1986г.). Все эксперименты проведены в

осенне-зимний период. Эксперименты *in vitro* проводили на образцах культур мононуклеаров (МНК) венозной крови, которую получали у доноров-добровольцев и пациентов ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г. Я. Ремишевской» с хроническим *Helicobacter pylori*-ассоциированным гастритом. В работе с пациентами и донорами соблюдали принципы Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации (1996г.), все испытуемые подписывали Форму информированного согласия до момента включения в исследование. Диагноз «хронический гастрит» устанавливался при морфологическом исследовании в соответствии с классификацией, разработанной на основе Сиднейской системы с использованием эзофагогастродуоденоскопии<sup>1</sup>.

Для изучения противомикробной активности использовали культуры микроорганизмов музейных штаммов, полученные из ФГУН «ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» и ГНУ ВНИИВВиМ РосСельхозАкадемии.

**Методы.** Иммуотропную активность изучали по влиянию на: неспецифическую резистентность, лимфопролиферативные процессы, фагоцитоз, функциональную активность нейтрофилов (НСТ-тест), гуморальный и клеточный иммунный ответ, продукцию цитокинов и иммуноглобулинов МНК (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012. С. 624-639)<sup>2</sup>.

Стафилококковую инфекцию моделировали однократным внутрибрюшинным введением культуры *S. aureus* в  $\frac{1}{2}LD_{50}$  209P (1 млрд. клеток) при оценке протективного действия и в 1DLM (4 млрд. клеток) при анализе влияния на неспецифическую резистентность. Расчет  $LD_{50}$  проводили методом Кербера (Ашмарин И. П., 1962).

Экспериментальную модель иммунодепрессии у животных создавали однократным введением циклофосфана (ЦФ) (ОАО «Биохимик», г. Саранск) внутрибрюшинно в максимально переносимой дозе (250 мг/кг).

---

<sup>1</sup>Выражаем искреннюю благодарность к.м.н., врачу высшей категории Н. Н. Буторину и врачу III категории Н. А. Россовой за предоставление материала для исследований.

<sup>2</sup>Выражаем искреннюю благодарность д.м.н. Е. Ю. Шерстобоеву и д.м.н. Н. В. Масной за научную консультативную помощь в постановке экспериментов.

Безопасность ФС изучали с учетом половых различий при однократном введении в дозе 1,0 г/кг веса (неинбредные мыши); 2,0, 4,0 и 5,0 г/кг веса (инбредные мыши); а также при курсовом введении (14 дней) в дозе 1,0 и 2,0 г/кг веса (неинбредные и инбредные мыши). Влияние на неврологические показатели оценивали в тесте «Открытое поле» (Буреш Я.П. и др., 1992; Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012. С13-23).

Скрининг противомикробной активности проводили диско-диффузионным методом. Для определения МБК и МПК извлечений использовали метод серийных разведений (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012. С.509-521). Микробная нагрузка составляла 1 млн. клеток/мл.

При фитохимических исследованиях использовали качественные реакции на группы БАС и хроматографические методы. ВЭЖХ проводили на аналитической системе (жидкостный хроматограф “Agilent 1200” с диодноматричным детектором, система для обработки хроматографических данных ChemStation). Разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C18 при градиентном режиме элюирования. Критериями для идентификации компонентов являлись: ГСО соединений; время удерживания, УФ-спектры, базы данных и обзорные статьи по основным спектральным характеристикам природных соединений. Количественное определение компонентов проводили по методу внешнего стандарта, неидентифицированных соединений – в пересчете на ГСО кверцетина. Количественное содержание групп БАС определяли хромато-спектрофотометрическим методом. Состав ЭМ определяли методом хромато-масс-спектрометрии на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5890/II. Содержание компонентов вычисляли по площадям газохроматографических пиков без использования корректирующих коэффициентов. Качественный анализ был основан на сравнении времени удерживания и полных масс-спектров с атласом спектров (Tkachev A.V., 2008) <sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Исследование выполнялось автором в Лаборатории фитохимии Центрального сибирского ботанического сада СО РАН и Лаборатории терпеновых соединений Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН совместно со с.н.с., к.б.н. М. А. Мяделец, за что выражаем искреннюю благодарность д.б.н. Г. И. Высочинной и д.х.н., профессору А. В. Ткачеву.

Изучение и описание онтогенеза *C. geoides* осуществляли с использованием общепринятых методик и рекомендаций по изучению редких видов (Работнов Т.А., 1950; Уранов А.А., 1975, Ценопопуляции растений, 1976; Жукова Л.А., 1995; Программа и методика наблюдений за ценопопуляциями видов растений Красной книги СССР, 1986). При характеристике популяционной структуры опирались на данные о классификации ЦП, характерном и базовом онтогенетических спектрах, показателе сходства ЦП (Уранов А.А, Смирнова О.В., 1969; Заугольнова Л.А., 1994; Животовский Л.А., 1979, 2001)<sup>1</sup>.

Анатомическую структуру *C. geoides* изучали микроскопическим методом, фотографии выполняли при помощи микроскопа «Миктрон 400 М» со встроенной видеокамерой. ЭМ обнаруживали реактивом Судан III, одревесневшие ткани – раствором сернокислого анилина (Фурст Г.Г., 1979). Ресурсные характеристики *C. geoides* определяли методами учётных площадок, модельных экземпляров и проективного покрытия (Методические рекомендации по изучению ресурсов лекарственных растений Сибири, 1988; Растения для нас, 1996).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программ «IBM SPSS Statistics 19» и «Statistica 6.1». Результаты исследования противомикробных свойств и химического состава, биометрические показатели представляли в виде среднего арифметического со стандартным квадратичным отклонением. Остальные результаты исследования – в виде медианы с интерквартильным размахом (25 и 75 %). Для проверки статистической значимости различий показателей использовали непараметрические критерии – Манна-Уитни (для сравнения независимых выборок) и Вилкоксона (для сравнения связанных выборок), при сравнении нескольких независимых групп – ранговый однофакторный анализ Краскела-Уоллиса. При оценке влияния извлечений на показатели гуморального иммунного ответа применяли многофакторный анализ (Петри А., Сэбин К., 2010; Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012, С.889-925). Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

---

Выражаем искреннюю благодарность д.б.н., проф. В. А. Черемушкиной за научную консультативную помощь.

### Результаты собственных исследований и их обсуждение

В главе 3 представлены результаты скрининга иммуностропной и противомикробной активности извлечений из сырья ЭМР.

В ЭМ из травы *Sm* обнаружено 63 компонента (идентифицировано 51), отмечено наличие компонентов ароматической структуры: бензальдегида (0,2 %), п-цимола (0,1 %) и эвгенола (0,1 %). В ЭМ из сырья *Tr* обнаружено 42 компонента (идентифицировано 35), из ароматических соединений обнаружен тимол (0,1 %). В составе ЭМ *Ns* обнаружено 30 компонентов (идентифицировано 10), обнаружен метиловый эфир карвакрола (0,5 %). При исследовании анатомического строения *Cg* нами было установлено, что ЭМ накапливается во всех органах растения. Кроме того, масса надземной части растения невелика по сравнению с подземными органами, поэтому для получения ЭМ использовали все корневища с корнями и траву. В составе ЭМ *Cg* было установлено 8 компонентов: гексанал, 1-гексанол, артемизия кетон, миртенол, транс-мартанол, перила альдегид, фелландрол и эвгенол (98,45 %).

Затем качественными реакциями и хроматографическими методами в сырье *Cg* (наименее изученного вида) были обнаружены полиацетиленовые соединения, кумарины, полисахариды, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, гидролизуемые и конденсированные дубильные вещества, следы сесквитерпеновых лактонов и сапонинов. Для ориентировочной оценки распределения БАС по органам растения определили количественное содержание катехинов, флавонолов и фенолкарбоновых кислот. Оказалось, что в качестве сырья для получения извлечений *Cg* целесообразно использовать все растение целиком (корневище с корнями и траву), а БАС извлекать 40 %-ным и 70 %-ным этанолом.

Влияние извлечений шести ЭМР на неспецифическую резистентность проводили на модели экспериментального стафилококкового сепсиса у инбредных мышей. В течение первых 3-х дней инфекционного процесса в контрольной группе пало 91,7 % животных (выживаемость 8,3 %). Наиболее эффективно, сопоставимо с действием ЛП сравнения (настойки эхинацеи), повышало устойчивость мышей к стафилококковой инфекции извлечение *Cg* (выживаемость животных – по 75,0 %). Выраженное стимулирующее действие на неспецифическую резистентность оказали извлечения из сырья *Ns* и *Pv* (выживаемость животных – по 66,7 %).



Стимулирующее влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови мышей достоверно в сравнении с контролем и сопоставимо с действием ЛП сравнения ( $p=0,397$ ) оказало только извлечение *Cg*. Интенсивность фагоцитоза достоверно стимулировали 4 из 6 изучаемых извлечений. Наиболее эффективным оказалось применение извлечений *Sm*, *Tr* и *Cg* (ФЧ составило 2,97 ( $2,44\div 3,31$ ); 2,87 ( $2,44\div 3,44$ ) и 2,56 ( $2,29\div 3,04$ ) частиц латекса/нейтрофил соответственно). Приведенные значения были достоверно ниже показателей животных, получавших ЛП сравнения.

Фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов мышей в сравнении с контролем достоверно стимулировали извлечения *Cg*, *Zc* и *Pv*: ФИ составил 48, 45 и 41 % соответственно (в контроле 22 %). Причем влияние извлечения *Cg* было достоверно эффективнее действия ЛП сравнения ( $p=0,004$ ). ФЧ достоверно увеличивало только извлечение *Cg*, уступая при этом ЛП сравнения.

На функциональную активность нейтрофилов мышей наибольшее влияние оказало извлечение *Ns*, индекс стимуляции (ИС) нейтрофилов периферической крови составил 2,65 ( $p=0,014$ ), ИС перитонеальных нейтрофилов – 3,03 у.е. ( $p=0,000$ ) (в контроле 2,23 и 1,45 у.е. соответственно). Извлечение *Cg* также влияло на этот показатель (индекс стимуляции 2,53 и 1,73 соответственно), но не достоверно.

Курсовое введение исследуемых извлечений приводило к достоверному повышению абсолютного числа лейкоцитов периферической крови от 7,20 ( $6,80\div 7,95$ )  $10^9/\text{л}$  (*Cg*) до 16,25 ( $13,15\div 18,71$ )  $10^9/\text{л}$  (*Zc*) по сравнению с контролем. По влиянию на этот показатель извлечения *Sm*, *Pv*, и *Zc* достоверно превосходили ЛП сравнения ( $p=0,021$ ; 0,006 и 0,001 соответственно). Общую клеточность селезенки достоверно снижали четыре исследуемых извлечения (*Ns*, *Zc*, *Tr* и *Pv*), остальные (и ЛП сравнения) – не изменяли. Увеличение абсолютного количества лейкоцитов при введении извлечений из сырья *Sm*, *Zc*, *Tr* и *Ns* было обусловлено перераспределением их фракций: увеличением числа гранулоцитов и уменьшением числа лимфоцитов. Под их влиянием происходил заметный сдвиг лейкоцитарной формулы влево (индекс ядерного сдвига 0,13-0,14) по сравнению с контролем (индекс ядерного сдвига 0,04). Введение животным извлечений *Ns* и *Pv* сопровождалось значительной стимуляцией гранулоцитопоэза (увеличением числа

юных и палочкоядерных нейтрофилов), что снижает их ценность в качестве иммуностимуляторов. Достоверного изменения относительного числа моноцитов, базофилов и эозинофилов все исследуемые извлечения не вызывали.

При анализе влияния извлечений ЭМР на продукцию основных цитокинов, опосредующих развитие гуморального и клеточного иммунного ответа оказалось, что только некоторые из исследуемых извлечений активируют спонтанную цитокинпродуцирующую способность МНК. Продукцию ИЛ-1 $\beta$  стимулировало только извлечение *Cg*, уровень продукции составил 183,95 (94,575 $\div$ 239,368) пкг/мл, что достоверно превышало контроль (77,120 (60,213 $\div$ 121,353) пкг/мл). Установили также стимулирующее действие извлечений *Cg* (20,935 (15,813 $\div$ 28,760) пкг/мл) и *Zc* (18,125 (16,705 $\div$ 30,473) пкг/мл) на продукцию ИЛ-2. Продукция ИНФ $\gamma$  при стимуляции МНК извлечением *Tr* составила 8,625 (2,063 $\div$ 10,155) пкг/мл (в контроле 0,000 (0,000 $\div$ 9,645) пкг/мл), при стимуляции извлечением *Cg* – 8,245 (5,828 $\div$ 11,510) пкг/мл, но различие с контролем было недостоверно. ЛП сравнения синтез ИЛ-1 $\beta$  стимулировал недостоверно (116,265 (76,668 $\div$ 144,438) пкг/мл), на продукцию ИЛ-2 и ИНФ $\gamma$  влияния не оказывал. Таким образом, полученные данные позволяют предположить у БАС *Cg* наличие иммуностимулирующего действия, направленного на активизацию пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, секреции иммуноглобулинов, фагоцитоза. Возможна индукция синтеза ИНФ $\gamma$ .

Так как о противомикробном действии ЭМ *Pv* и *Sm* уже известно, нами были изучены противомикробные свойства ЭМ, полученных из сырья *Ns*, *Zc*, *Tr*, *Cg*. В отношении *S. aureus* по б/цидному эффекту ЭМ *Tr*, *Zc*, *Cg* и *Ns* (диаметр б/цидной зоны 5,20; 4,50; 3,60 и 3,00 см соответственно) достоверно превосходили действие ЭМ *O. vulgare* и *A. calamus* (1,30 и 1,25 см соответственно). Максимальные б/статические зоны сформировали ЭМ *Tr* (5,90 $\pm$ 0,26 см) и *Zc* (5,40 $\pm$ 0,24 см). В отношении *P. aeruginosa* ЭМ три из исследуемых образцов ЭМ (*Cg*, *Ns*, *Tr*) достоверно превосходили б/цидное действие ЭМ *O. vulgare* (0,70 $\pm$ 0,15 см); два образца – действие ЭМ *A. calamus* (1,59 $\pm$ 0,30). Максимальный эффект проявили ЭМ *Cg* и *Ns* (диаметр б/цидной зоны 3,70 $\pm$ 0,23 см и 2,90 $\pm$ 0,20 см), эти же ЭМ проявили и б/статическое действие, достоверно более выраженное, чем у ЭМ *A. calamus*. Противомикробная активность отгонных вод *Ns* в отношении *S. aureus*

(5,10±0,20 см б/цидная и 6,10±0,28 см б/статическая зона) достоверно превосходила действие *O. vulgare* и *A. calamus*. Отгонные воды *Cg* (диаметр б/статической зоны 2,60±0,17 см) достоверно были эффективнее действия *O. vulgare*. В отношении *P. aeruginosa* можно отметить лишь б/статическое действие отгонных вод *Cg* (3,40±0,19см), достоверно более эффективное, чем действие *O. vulgare* и *A. calamus*. И б/статическое действие отгонных вод *Tr* (2,10±0,16 см), достоверно превосходящее эффект отгонных вод только *O. vulgare*.

В отношении *S. aureus*. максимальную активность (такую же, как извлечения *O. vulgare*), проявили водные извлечения *Cg*, а также этаноловые извлечения *Cg* и *Zc* (МПК 3,13 мг/мл). МПК водного извлечения *A. calamus*, а также этаноловых извлечений *Zc*, *Pv* и *Sm* составили 6,25 мг/мл. Для дальнейшего изучения наиболее перспективным являются комплексы БАС из сырья *Cg*. Обращает на себя внимание также высокая активность ЭМ *Tr* и *Zc* в отношении *S. aureus*. Кроме того, при получении ЭМ *Tr*, *Cg* и *Ns* целесообразно сохранять и использовать отгонные воды.

Для оценки спектра противомикробной активности этаноловых извлечений *Cg* исследовали их влияние на культуры грамотрицательных и грамположительных бактерий (таблица 1).

Таблица 1 – Противомикробное действие извлечений *Cg*

Тест-культура микроорганизмов	Доза, мг/мл в отношении тест-культур микроорганизмов, $\bar{x} \pm S_x$ , n=6			
	С-1		С-2	
	МБК	МПК	МБК	МПК
<i>S. aureus</i> P209	7,1±0,5	2,8±0,5	8,2±0,4	4,1±0,8
<i>S. aureus</i> P209S	4,0±0,7	3,1±0,4	3,3±1,1	1,6±0,5
<i>S. aureus</i> P209R	-	14,2±0,6	14,2±0,7	4,1±0,4
<i>M. lysodenticus</i> 2665	3,6±0,5	3,6±0,4	4,1±0,5	2,1±0,5
<i>S. pyogenes</i> 289	7,1±0,7	3,2±0,8	8,3±0,6	4,5±0,5
<i>B. cereus</i> 168	4,2±0,6	2,6±0,4	4,5±0,8	3,0±0,6
<i>P. aeruginosa</i> 453	14,2±0,7	7,1±0,7	16,4±0,8	8,6±0,6
<i>E. coli</i> 25922	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 1257	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11	14,2±1,0	7,1±0,7	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 204	-	14,2±1,1	-	-
<i>P. vulgaris</i> O42	14,2±0,8	8,0±0,9	-	-

Примечания:

1. С-1 – извлечение из сырья *C. geoides*, полученное 40 %-ным спиртом этиловым, С-2 – 70 %-ным спиртом этиловым,
2. МБК – минимальная бактерицидная концентрация, МПК – минимальная подавляющая концентрация,
3. прочерк означает отсутствие эффекта.

Этаноловые извлечения *Cg* проявили выраженное противомикробное действие, в основном, в отношении грамположительных бактерий. Извлечение С-1 было активно и в отношении некоторых грамотрицательных бактерий (*E. coli* 11, *K. pneumonia* 204, *P. vulgaris* O42).

Таким образом, в качестве основы для разработки фармацевтической субстанции с иммуностимулирующим и противомикробным действием считаем наиболее перспективными комплексы БАС из сырья *Cg*, которые: стимулируют лимфопролиферативные процессы, фагоцитоз, окислительный взрыв в нейтрофилах и цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов сопоставимо (а в некоторых случаях превосходя) с действием ЛП сравнения (настойки эхинацеи); обладают противомикробным действием в отношении грамположительных бактерий и некоторых грамотрицательных бактерий.

В главе 4 представлены результаты исследования иммуностимулирующих свойств суммарных извлечений из сырья *Cg*: С-1 (40 %-ным этанолом) и С-2 (70 %-ным этанолом).

Одним из основных направлений иммуностимуляции рассматривается влияние на экспансию иммунокомпетентных клеток (Добродеева Л.К. и др., 2014; Караулов А.В., Калюжин О.В., 2013). Введение мышам извлечений *Cg* приводило к достоверному увеличению абсолютного числа лейкоцитов периферической крови. Так, в группе животных, получавших С-1, этот показатель достигал  $7,20 (6,80 \div 7,95) \times 10^9 / \text{л}$ . У животных, получавших С-2 –  $16,00 (14,30 \div 18,75) \times 10^9 / \text{л}$  (в контроле –  $6,10 (4,25 \div 6,70) \times 10^9 / \text{л}$ ), что достоверно превышало эффект ЛП сравнения. На число спленоцитов селезенки применение исследуемых извлечений не оказало достоверного влияния. В условиях экспериментального иммунодефицита (введение ЦФ) исследуемые извлечения также проявили стимулирующий эффект в отношении лимфопролиферативных процессов. При курсовом введении извлечения С-1 отмечали достоверное увеличение массы селезенки до  $0,097 (0,091 \div 0,120) \text{ г}$  ( $p=0,045$ ) и числа спленоцитов селезенки до  $117,63 (100,56 \div 119,50) \times 10^6 / \text{орган}$  ( $p=0,001$ ), что было сопоставимо с показателем животных без иммунодефицита (иммунокорректирующее действие!). Введение животным С-2 и ЛП сравнения не оказало достоверного влияния на оцениваемые показатели.

Важным аспектом иммунного ответа, кроме того, является процесс фагоцитоза. Фагоцитарная активность нейтрофилов является показателем, характеризующим напряженность иммунного ответа при бактериальных инфекциях (Гладько В.В. и др., 2010; Потапова И.С. и др., 2011; Шмагель К.В., 2012; Добродеева Л.К., 2014). Активность фагоцитоза нейтрофилами периферической крови достоверно (в 1,30 раза) стимулировало только введение животным извлечения С-1, что было сопоставимо с действием ЛП сравнения (увеличивающим этот показатель в 1,25 раза) (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние извлечений Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов, Медиана (25%÷75%), n=9-10

Группа животных	Нейтрофилов периферической крови		Перитонеальных нейтрофилов	
	ФИ, % фагоцитирующих нейтрофилов	ФЧ, частиц латекса/нейтрофил	ФИ, % фагоцитирующих нейтрофилов	ФЧ, частиц латекса/нейтрофил
1-ая контрольная	28,0 (25,0÷32,0)	1,60 (1,44÷1,64)	28,0 (20,0÷35,0)	2,52 (2,06÷3,03)
1-ая экспериментальная (ЛП сравнения)	35,0 (24,0÷38,0)	3,92 (3,69÷4,81)*	35,0 (32,8÷44,5)*	4,49 (4,03÷5,73)*
2-ая экспериментальная (С-1)	36,5 (33,3÷40,8)*	2,56 (2,29÷3,04)*#	48,0 (44,0÷57,5)*#	2,70 (2,40÷3,34)#
3-я экспериментальная (С-2)	32,3 (23,5÷35,6)	2,15 (1,78÷2,91)*#	44,2 (40,5÷51,4)*	2,56 (2,25÷3,12)#

Примечание – различие достоверно при  $p \leq 0,05$  с показателями \* – контроля, # – ЛП сравнения (настойка эхинацеи).

Интенсивность фагоцитоза достоверно стимулировало применение двух исследуемых извлечений (в 1,6 и 1,3 раза), но в меньшей степени, чем ЛП сравнения. БАС Сg также стимулировали активность и интенсивность фагоцитоза перитонеальных нейтрофилов: введение С-1 приводило к увеличению ФИ в 1,70 раза, что достоверно эффективнее ЛП сравнения, увеличивающего этот показатель в нашем эксперименте всего в 1,25 раза.

На фоне экспериментального иммунодефицита (введение ЦФ) стимулирующее влияние на фагоцитоз нейтрофилов периферической крови оказывало только извлечение С-1, достоверно повышая ФИ в 1,7 раза по

сравнению с иммунодепрессированными животными. Причем под влиянием С-1 этот показатель достигал значения животных контрольной группы без иммунодефицита (иммунокорригирующее действие!). Фагоцитоз перитонеальных нейтрофилов на фоне иммунодефицита достоверно в 2,5 раза (сопоставимо с действием ЛП сравнения) стимулировало введение обоих исследуемых извлечений (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние извлечений Сg на фагоцитарную активность нейтрофилов при экспериментальном иммунодефиците, Медиана (25%÷75%), n=9-10

Группа животных	Нейтрофилов периферической крови		Перитонеальных нейтрофилов	
	ФИ, % фагоцитирующих нейтрофилов	ФЧ, частиц латекса/нейтрофил	ФИ, % фагоцитирующих нейтрофилов	ФЧ, частиц латекса/нейтрофил
1-ая контрольная (физ. р-р)	28,0 (25,0÷32,0)	1,60 (1,44÷1,64)	28,0 (20,0÷35,0)	2,52 (2,06÷3,03)
2-ая контрольная (ЦФ)	17,0 (16,0-20,0) &	1,50 (1,28-1,74)	13,0 (8,5÷19,3)&	1,93 (1,65÷2,34)&
1-ая экспериментальная (ЦФ+ЛП сравнения)	14,0 (13,0-22,0)	1,54 (1,36-2,00)	37,0 (20,3÷53,8)*	2,42 (1,64÷3,53)
2-ая экспериментальная (ЦФ+С-1)	29,0 (22,0÷35,0)*#	1,65 (1,48÷1,77)	32,0 (13,3÷55,0)*	3,32 (1,70÷3,92)
3-ая экспериментальная (ЦФ+С-2)	19,0 (15,5÷21,5)	1,40 (1,31÷1,65)	32,0 (25,0÷32,0)*	2,44 (2,03÷2,90)

Примечание – различие достоверно при  $p \leq 0,05$  между показателями: & – 1 и 2 контрольной группы; \* – экспериментальных и 2-ой контрольной группы (с экспериментальным иммунодефицитом).

В эксперименте *in vitro* добавление к образцам крови доноров С-1 и С-2 достоверно стимулировало активность и интенсивность фагоцитоза: ФИ составил 73,5 (68,3÷40,8) % и 73,5 (69,3÷76,8) % соответственно (в контроле 59,0 (53,0÷69,5) %). ФЧ достигло значений 4,10 (3,92÷5,00) и 5,59 (4,46÷6,75) частиц латекса/нейтрофил соответственно (в контроле 3,23 (2,63÷4,28)). Но иммуностимулирующее действие извлечений Сg было достоверно ниже, чем влияние ЛП сравнения (ФИ – 59,0 (53,0÷69,5) %, ФЧ – 3,23 (2,63÷4,28) частиц латекса/нейтрофил).

Влияние извлечений Сg на гуморальный иммунный ответ оценивали по их способности стимулировать синтез антиэритроцитарных антител и

лимфопролиферативные процессы в селезенке после иммунизации животных тимусзависимым антигеном – эритроцитами барана (ЭБ). Введение животным извлечений С-1 и С-2 приводило к достоверному увеличению числа спленоцитов селезенки в сравнении с контролем на 7-ой день после иммунизации, достоверно уменьшалось на 14-ый день и возвращалось к фоновым значениям к 21-му дню. Введение ЛП сравнения приводило к достоверному увеличению числа спленоцитов селезенки на всем протяжении эксперимента, кроме 14 дня после иммунизации ЭБ.

Максимум накопления антителообразующих клеток селезенки (АОК), синтезирующих антиэритроцитарные антитела, у мышей контрольной группы приходилось на 14-ый день после иммунизации ЭБ, затем значительно уменьшалось. Курсовое введение животным С-1 и С-2 приводило к достоверному уменьшению этого показателя на 7-ой и 14-ый дни после иммунизации, существенно не влияя в начале и конце развертывания иммунного ответа. Применение ЛП сравнения привело к достоверному снижению числа АОК селезенки с 7-го по 21-ый дни эксперимента (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние извлечений Сg на пролиферацию антителообразующих клеток селезенки, Медиана (25%÷75%), n=8-10

Группа животных	Относительное число АОК селезенки, %			
	4 день	7 день	14 день	21 день
Контрольная (без стимуляции)	24,25 (23,05÷26,95)	29,00 (27,45÷32,25)	31,20 (28,60÷32,50)	18,20 (15,50÷20,75)
1-ая экспериментальная (ЛП сравнения)	23,40 (21,33÷25,83)#	20,60 (19,00÷21,40)*#	19,00 (16,40÷19,40)*#	19,60 (18,20÷20,60)#
2-ая экспериментальная (С-1)	25,70 (24,03÷27,03)#	24,20 (22,25÷24,20)*#	19,60 (19,20÷19,80)*#	19,40 (18,30÷21,30)#
3-я экспериментальная (С-2)	18,85 (17,68÷19,20)	17,50 (17,00÷17,85)*	14,00 (13,20÷16,20)*	14,80 (13,00÷15,90)*

Примечание – различие достоверно при  $p \leq 0,05$  с показателями \* – контроля, # – ЛП сравнения (настойки эхинацеи).

Применение извлечений Сg приводило к достоверному увеличению титра суммарных иммуноглобулинов (Ig) к ЭБ в сравнении с контролем на 7-ой (С-2) и 14-ый (С-1) день после иммунизации. В последующие дни этот показатель у мышей экспериментальных групп продолжал повышаться, тогда, как в контрольной группе снизился до первоначальных значений. Извлечения Сg стимулировали синтез суммарных Ig сопоставимо с действием ЛП сравнения, в

некоторых случаях (С-2 на 7-ой день после иммунизации) достоверно превосходя его (рисунок 1а). Под влиянием С-1 и С-2 титр Ig класса G (IgG) превышал значения контроля, начиная с 7-го дня после иммунизации (на 14-ый и 21-ый дни был достоверно выше). В этом случае стимулирующий эффект извлечений Сg был сопоставим с действием ЛП сравнения (рисунок 1б).

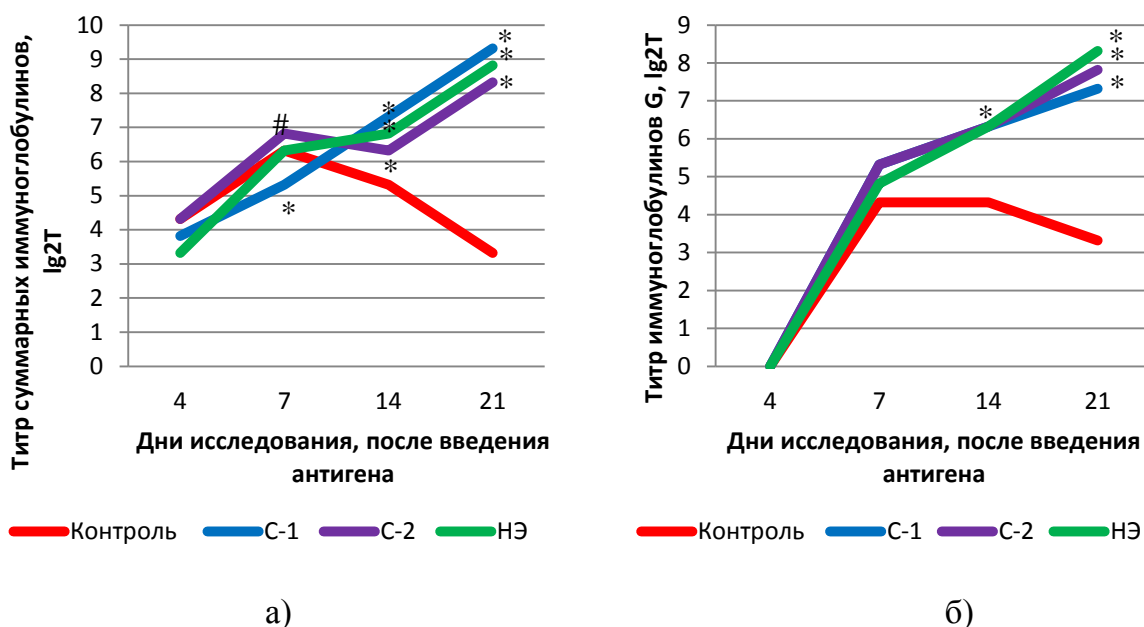


Рисунок 1 – Влияние извлечений Сg и настойки эхинацеи (НЭ) на синтез антител к эритроцитам барана

(\* -  $p \leq 0,05$  – степень достоверности различия относительно контроля,  
# -  $p \leq 0,05$  – степень достоверности различия относительно препарата сравнения (НЭ).

На фоне экспериментального иммунодефицита применение извлечений Сg устраняло иммунодепрессивное действие ЦФ, достоверно в 1,6-5,8 раза в динамике (с 4 по 21 день после введения ЭБ) увеличивая число спленоцитов селезенки (таблица 5). На 7 день этот показатель был выше уровня показателей животных без иммунодефицита. Наиболее выраженный эффект на 4 и 7 день исследования, достоверно превосходящий действие ЛП сравнения, проявило извлечение С-2. Однако, в дальнейшем (на 14-21 дни эксперимента) под действием С-2 число спленоцитов селезенки значительно снижалось. Таким образом, для извлечений Сg характерно иммунокорректирующее действие, преимущественно на начальном этапе гуморального иммунного ответа: для С-1 – сопоставимое с действием ЛП сравнения, для С-2 – превосходящее на 7-ой день. Причем действие извлечения С-1



на завершающем этапе иммунного ответа вызывало менее выраженное истощение пула спленоцитов селезенки.

Таблица 5 – Влияние извлечений Сg на иммунопролиферативные процессы в селезенке при экспериментальном иммунодефиците, Медиана (25%÷75%), n=8-10

Группа животных	Число кариоцитов селезенки, млн. клеток/орган			
	4 день	7 день	14 день	21 день
1-ая контрольная (физ. р-р)	126,25 (118,94÷170,50)	106,00 (93,75÷117,45)	153,75 (138,75÷155,50)	129,25 (86,75÷138,75)
2-ая контрольная (ЦФ)	29,50 (21,44÷48,06)&	46,50 (34,25÷50,25)&	66,87 (56,75÷73,31)&	52,88 (38,25÷70,00)&
1-ая экспериментальная (ЛП сравнения + ЦФ)	63,50 (56,13÷83,50)*	198,50 (185,75÷24,69)*	116,25 (103,50÷166,25)	87,50 (71,37÷114,19)*
2-ая экспериментальная (С-1 + ЦФ)	69,75 (33,25÷90,25)*	151,88 (109,00÷197,88)*	105,75 (96,38÷107,50)*	104,25 (74,88÷114,63)*
3-я экспериментальная (С-2 + ЦФ)	75,25 (64,52÷83,50)*#	270,00 (233,25÷312,12)* #	89,25 (85,50÷115,50)*	88,88 (55,25÷112,69)*

Примечание – различие достоверно при  $p \leq 0,05$  между показателями: & – 1 и 2 контрольной группы; \* – экспериментальных и 2-ой контрольной группы (с экспериментальным иммунодефицитом); # – групп животных, получавших исследуемые извлечения и ЛП сравнения; ! – экспериментальных и 1 контрольной группы (без иммунодефицита).

Введение ЦФ привело к достоверному угнетению синтеза суммарных Ig к ЭБ, которые были обнаружены в сыворотке крови животных 2-ой контрольной группы только на 14 день ( $Ig_2T=0,00$  (0,00÷1,16)). Исследуемые извлечения достоверно в 3,8-8,3 раза увеличивали титр суммарных Ig (рисунок 2а). Под действием С-2 титр суммарных Ig к ЭБ достигал значений животных без иммунодефицита уже к 7 дню, к 21 суткам увеличивался до 8,32 (5,32÷9,32) у. е., превышая показатель интактных животных в 2,5 раза ( $p=0,000$ ). Извлечения С-1 и С-2 оказывали иммунокорректирующее действие на синтез суммарных антител к ЭБ, статистически сопоставимое с действием ЛП сравнения, но более длительно поддерживали их титр на высоком уровне. Антиэритроцитарные IgG к ЭБ у животных 2-ой контрольной группы не обнаруживались в течение эксперимента (рисунок 2б). С-1 достоверно на 14-21 день, С-2 достоверно в течение всего периода исследования увеличивали титр IgG до значений у животных 1-ой контрольной группы и выше ( $p=0,002$ ,  $p=0,000$ ) сопоставимо с действием ЛП сравнения, но способствовали поддержанию их концентрации в сыворотке крови

более продолжительное время и достоверно ( $p \leq 0,001$ ) на более высоком уровне на 21 день после введения ЭБ (иммунокорригирующее действие!).

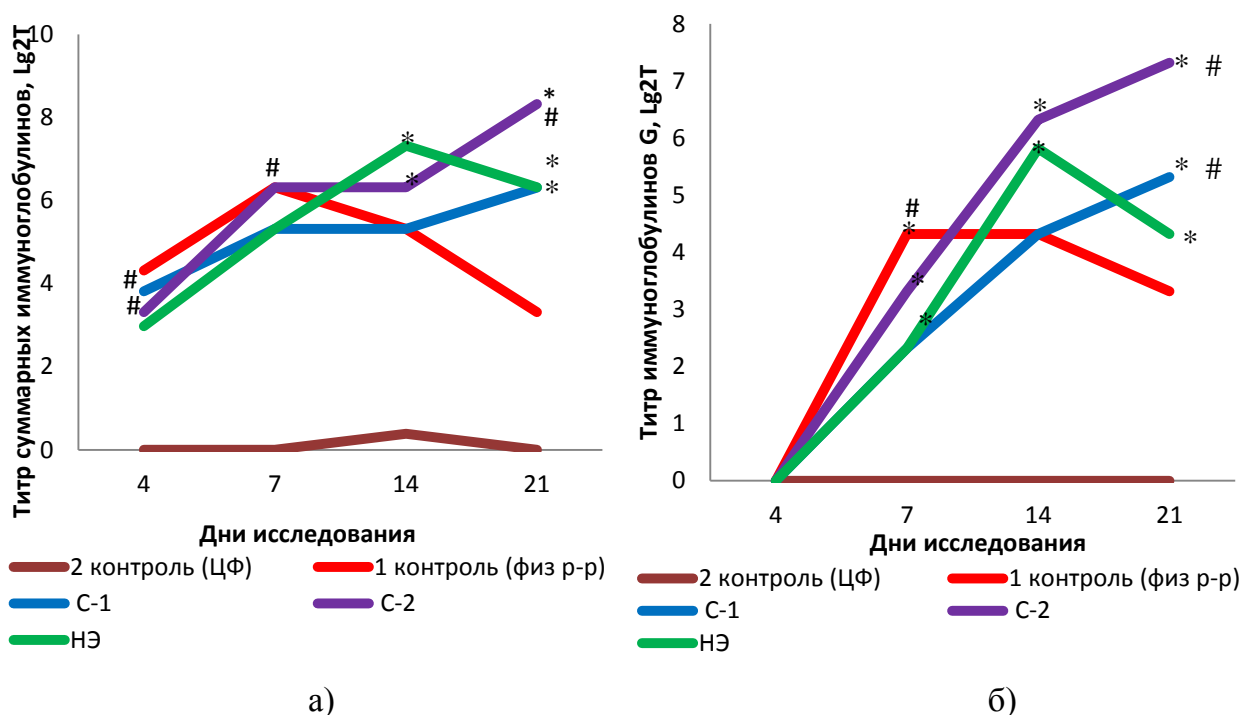


Рисунок 2 – Влияние извлечений Сg и настойки эхинацеи (НЭ) на синтез суммарных иммуноглобулинов к ЭБ в условиях иммунодепрессии

(\* -  $p \leq 0,05$  – степень достоверности различия относительно контроля 1,  
# -  $p \leq 0,05$  – степень достоверности различия относительно ЛП сравнения (НЭ).

Введение мышам исследуемых извлечений вызывало достоверное иммунокорригирующее действие, направленное на процесс пролиферации специализированных АОК селезенки, в период с 4 по 14 день достоверно в 1,3-2,2 раза увеличивалось по сравнению с показателями животных 2 контрольной группы. Причем значение этого показателя у животных, получавших С-1, достоверно ( $p=0,017$ ) превысило показатель интактных животных (таблица 6). Извлечения С-1 и С-2, оказывали сопоставимое действие в этом направлении, но под действием С-1 пик иммунокорригирующего действия совпадал по времени с максимумом пролиферативного эффекта у интактных мышей, а под действием С-2, приходился на завершающий этап иммунного ответа. В процессе исследования наблюдали некоторое несоответствие между показателями титров антител и числа АОК селезенки при использовании ЛП сравнения. По-видимому, использование

настойки эхинацеи приводит к мобилизации синтетических способностей АОК, существенно не влияя на процессы их пролиферации.

Таблица 6 – Влияние извлечений Сg на пролиферацию АОК селезенки (Медиана (25%÷75%), n=8-10)

Группа животных	Относительное число АОК селезенки, %			
	4 день	7 день	14 день	21 день
1-ая контрольная (физ. р-р)	25,0 (22,7÷27,9)	29,0 (27,5÷32,3)	31,2 (28,6÷32,5)	18,2 (15,5÷20,8)
2-ая контрольная (ЦФА)	8,2 (6,2÷10,0)&	19,0 (17,6÷20,7)&	25,8 (24,1÷26,2)&	10,8 (10,2÷11,5)&
1-ая экспериментальная (ЛП сравнения+ЦФА)	9,6 (8,0÷10,9)	12,0 (11,5÷12,8)*	16,2 (14,8÷16,6)*	20,6 (18,2÷20,2)*
2-ая экспериментальная (С-1+ЦФА)	16,0 (14,3÷18,2)*#!	23,8 (22,6÷26,5)*#	35,6 (33,8÷38,2)*#!	15,6 (15,3÷16,8)*
3-я экспериментальная (С-2+ЦФА)	16,8 (14,0÷18,3)*#!	26,0 (24,8÷26,6)*#	28,8 (27,6÷30,8)*#	24,0 (22,8÷24,6)*#!

Примечание – различие достоверно при  $p \leq 0,05$  между показателями: & – 1 и 2 контрольной группы; \* – экспериментальных и 2-ой контрольной группы (с экспериментальным иммунодефицитом); # – групп животных, получавших исследуемые извлечения и ЛП сравнения; ! – экспериментальных и 1 контрольной группы (без иммунодефицита).

Результаты многофакторного анализа показателей гуморального иммунного ответа свидетельствуют об отличии эффектов извлечений С-1 и С-2 и настойки эхинацеи. В общем, при отсутствии нарушений иммунного ответа иммуностимулирующее действие извлечений Сg превосходит ЛП сравнения по влиянию на пролиферацию спленоцитов селезенки, синтез суммарных Ig и IgG в разгаре иммунного ответа и на пролиферацию АОК селезенки на завершающем этапе иммунного ответа. В условиях экспериментального иммунодефицита извлечения Сg действуют более эффективно на пролиферацию спленоцитов селезенки в начале иммунного ответа, на синтез суммарных Ig на завершающем этапе иммунного ответа, синтез IgG на 7 и 21 дни после иммунизации, на пролиферацию АОК селезенки в начале и в разгаре иммунного ответа.

Таким образом: исследуемые извлечения Сg оказывают более выраженное в среднем на 21-43 % ( $p=0,001-0,008$ ) стимулирующее действие на синтез специфических Ig и пролиферацию АОК селезенки, чем настойка эхинацеи.

Влияние комплексов БАС на клеточный иммунный ответ изучали при постановке реакции ГЗТ. Стимуляция клеточного иммунного ответа может быть

полезна при лечении вирусных инфекций и бактериальных инфекций, вызванных внутриклеточными паразитами, а также в терапии онкозаболеваний (Козлов В.А., 2009; Ярилин А.А., 2010; Карамов Э.В., Петров Р.В., 2011; Колобовникова Ю.В. и др., 2012). Введение животным исследуемых извлечений на стадии сенсibilизации не приводило к достоверному изменению индекса воспаления, как в обычных условиях, так и на фоне экспериментального иммунодефицита (таблица 7).

Таблица 7 – Влияние извлечений Сg на клеточный иммунный ответ при постановке реакции ГЗТ, Медиана (25%÷75%), n=8-10

Группа животных	Индекс воспаления в реакции ГЗТ, %	
	в обычных условиях	в условиях экспериментального иммунодефицита
<i>1 схема ГЗТ (введение извлечений до сенсibilизирующей дозы антигена)</i>		
1-ая контрольная	6,07 (2,58÷6,70)	1,86 (1,24÷4,17)
1-ая экспериментальная (ЛП сравнения)	6,32 (5,17÷8,00)	1,69 (0,86÷2,70)
2-ая экспериментальная (С-1)	2,71 (2,05÷7,14)	1,88 (1,74÷2,76)
3-я экспериментальная (С-2)	3,54 (2,27÷7,20)	3,18 (1,83÷6,36)
<i>2 схема ГЗТ (введение извлечений до разрешающей дозы антигена)</i>		
2-ая контрольная	7,03 (4,29÷10,28)	2,99 (2,65÷3,84)
4-ая экспериментальная (ЛП сравнения)	3,53 (2,20÷5,78)	3,27 (1,42÷7,27)
5-ая экспериментальная (С-1)	13,21 (9,56÷18,82)*#	2,08 (1,67÷2,60)*
6-ая экспериментальная (С-2)	12,07 (7,82÷19,54) *#	2,49 (2,16÷5,03)

Примечание - различие достоверно при  $p \leq 0,05$  для показателей: \* - контрольных и экспериментальных групп, # - групп животных, получавших исследуемые препараты и препарат сравнения.

Введение извлечений С-1 и С-2 на стадии разрешения ГЗТ приводило к стимуляции воспалительной реакции: индекс воспаления увеличился в 1,9 и 1,7 раза соответственно, что, возможно, указывает на стимуляцию БАС Сg синтеза провоспалительных цитокинов. При экспериментальном иммунодефиците у животных контрольных групп происходило заметное угнетение клеточного иммунного ответа: индекс воспаления снизился в 3,26 (1-ая схема ГЗТ) и в 2,35 (2-ая схема ГЗТ) раза. Исследуемые извлечения и ЛП сравнения не оказывали влияния

на пролиферацию антигенспецифических Т-лимфоцитов. На продукцию провоспалительных цитокинов оказало влияние только введение С-1, индекс воспаления в реакции ГЗТ (2,08 (1,67÷2,60) %) был достоверно ниже показателя животных контрольной группы. Следовательно, извлечения Сg. оказывают влияние на клеточно-опосредованный иммунный ответ, стимулируя синтез провоспалительных цитокинов цитотоксическими Т-лимфоцитами. В условиях иммунодефицита исследуемые извлечения иммунокорректирующими свойствами в отношении клеточного иммунного ответа не обладают.

Далее, с целью оценки влияния извлечений Сg на ключевые механизмы реализации иммунного ответа изучили их действие на цитокинпродуцирующую активность МНК периферической крови доноров-добровольцев. Как показали результаты ИФА, исследуемые извлечения оказывают стимулирующее влияние на спонтанную продукцию ИЛ-1, ИС составил от 1,88 (С-2) до 2,39 (С-1) у.е., что было менее эффективно, чем стимуляция ФГА. Извлечения Сg также стимулировали продукцию ИЛ-2, ИС составил от 1,58 (С-2) до 2,27 (С-1) у.е. Извлечение С-1 проявило более выраженный стимулирующий эффект, чем стимуляция ФГА (ИС 2,14 у.е.). В нашем исследовании извлечения Сg не стимулировали продукцию ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  и достоверно не влияли на продукцию ИНФ $\gamma$ , хотя тенденцию к стимуляции его синтеза была отмечена. Индуцированную ФГА цитокинпродуцирующую активность МНК извлечения Сg не изменяли. При анализе влияния извлечений С-1 и С-2 на цитокинпродуцирующую активность МНК периферической крови больных хроническим гастритом на фоне персистенции *Helicobacter pylori*, сопровождающимся иммунодефицитом (Агеева Е.С. и др., 2009), установили, что они стимулируют продукцию ИЛ-1 $\beta$  более эффективно (ИС от 3,24 до 3,96 у.е.). Причем действие извлечения С-1 было достоверно более эффективным, чем ЛП сравнения (индекс стимуляции 1,89 у.е.). На продукцию ИЛ-2 исследуемые комплексы БАС также произвели стимулирующий эффект (ИС 3,44-3,74 у.е.), но сопоставимый с действием настойки эхинацеи (индекс стимуляции 3,77 у.е.). Для БАС растительного происхождения известны подобные эффекты (Капай Н.А., 2010; Pantsulaia I. et al., 2010; Park, H.J. et al., 2014).

Таким образом, комплексы БАС Cg значительно стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2) МНК периферической крови условно здоровых людей и пациентов с иммунодефицитом и не оказывают достоверного влияния на синтез ИЛ-8, ФНО $\alpha$  и ИНФ $\gamma$ . Эта способность, по-видимому, лежит в основе их механизма действия.

Исследование влияния извлечений Cg на синтез Ig *in vitro* проводили на культуре МНК периферической крови условно здоровых доноров. В результате установили, что извлечения С-1 и С-2 достоверно стимулировали синтез IgM, повышая его содержание с 3,23 (2,77 $\div$ 3,23) мг/мл (контроль) до 3,91 (3,33 $\div$ 4,51) мг/мл (С-1) и до 4,17 (3,47 $\div$ 4,53) мг/мл (С-2). ИС составили 1,21 и 1,29 соответственно. С-1 также достоверно ( $p=0,02$ ) стимулировало синтез IgA, повышая его содержание с 2,29 (1,66 $\div$ 3,09) мг/мл (контроль) до 3,22 (2,85 $\div$ 3,64) мг/мл (С-1); ИС составил 1,41. На синтез IgG исследуемые извлечения также оказывали стимулирующее влияние, но различие с контролем было недостоверно.

Обобщая все вышесказанное, можно заключить, что извлечения *C. geoides* превосходят настойку эхинацеи по: иммуностимулирующему действию, направленному на продукцию провоспалительных цитокинов и синтез Ig; иммунокорригирующему действию, направленному на пролиферацию АОК селезенки в процессе гуморального иммунного ответа. Для дальнейших исследований в качестве ФС предлагаем использовать извлечение С-1 (далее – субстанцию Cg), как проявившее более выраженное иммуностимулирующее действие, а также более широкий спектр антимикробной активности, чем извлечение С-2.

С целью выявления действующих веществ субстанции Cg было получено 5 фракций, из которых три содержали следовые количества БАС. Иммуностимулирующую активность этаноловой (CgE) и водной (CgA) фракций исследовали только в отношении показателей, которые стимулировало (или корригировало) применение цельной субстанции Cg. Подобный подход является традиционным для изучения суммарных растительных препаратов (Плотников М.Б. и др., 2000; Хобракова В.Б. и др., 2010). В эксперименте *in vivo* водная фракция (CgA) стимулировала активность фагоцитоза в 1,89 раза (цельная Cg – в 2,18 раза), интенсивность фагоцитоза – в 1,39 раза (цельная Cg – в 1,23). Эффект CgE был достоверно ниже, чем у цельной субстанции Cg. Этаноловая фракция стимулировала окислительный

взрыв в 4,00 раза, водная – в 2,71 раза, что достоверно ( $p=0,000$  и  $0,007$  соответственно) выше показателей мышей, получавших цельную Сg. В эксперименте *in vitro* после культивирования проб крови доноров с Сg и ее фракциями оказалось, что СgА достоверно стимулирует активность фагоцитоза (по сравнению с контрольными образцами) в 1,92 раза (Сg – в 1,51 раза). Интенсивность фагоцитоза достоверно в сравнении с контролем стимулировала только фракция СgЕ (в 1,63 раза), что было сопоставимо с эффектом цельной Сg (увеличивающее ФИ в 1,57 раза).

Фракции субстанции Сg оказывали неодинаковое влияние на первичный гуморальный иммунный ответ. СgА не влияла на пролиферацию спленоцитов селезенки в обычных условиях, СgЕ на 7 день достоверно стимулировала этот процесс, а на 14 день вызывала истощение пула клеток. В условиях иммунодефицита (ЦФ) СgЕ и СgА проявляли иммунокорригирующее действие, достоверно в 1,6-5,8 раза в динамике увеличивая число спленоцитов селезенки выше уровня показателей интактных животных. Эффективнее была фракция СgА, стимулирующая пролиферацию лейкоцитов в течение всего периода исследования сопоставимо с действием ЛП сравнения. Влияние на синтез суммарных Ig в обычных условиях было более выражено также при введении СgА. При экспериментальном иммунодефиците фракции Сg также достоверно в 3,8-8,6 раза (в динамике) увеличивали титр суммарных Ig сопоставимо с ЛП сравнения. Причем в этом варианте эксперимента фракции проявили одинаковое иммунокорригирующее действие. СgЕ и СgА одинаково (и превосходя действие ЛП сравнения) увеличивали титр IgG в 1,9 раза на 7 день (достоверно превосходя при этом действие ЛП сравнения) и в 1,5 раза на 14 день (сопоставимо с действием ЛП сравнения). Под влиянием фракций Сg в обычных условиях число АОК селезенки незначительно, но достоверно снижалось на 7 день в сравнении с интактным контролем с 29,0 % (контроль) до 25,0 % (СgЕ) и 27,2 % (СgА); на 14 день – было сопоставимо с ним. На фоне иммунодепрессии только фракция СgА достоверно стимулировала пролиферацию АОК, увеличивая этот показатель с 19,0 % (у иммунодепрессированных животных) до 23,8%.

Влияние фракций субстанции Сg на клеточный иммунный ответ исследовали на модели ГЗТ без иммунодепрессии. На стадии сенсibilизации обе фракции

достоверно угнетали процесс формирования клона антигенспецифических Т-лимфоцитов, что приводило к снижению индекса воспаления в 2,1 и 4,3 раза соответственно. На стадии разрешения введение СgА привело к достоверной (и сопоставимой с действием цельной субстанции Сg) стимуляции воспалительной реакции: увеличению индекса воспаления в 2,1 раза. Следовательно, фракции влияют на клеточно-опосредованный иммунный ответ в целом так же, как цельное извлечение.

Таким образом, иммуотропная активность водной и этаноловой фракций субстанции Сg различается. Водная фракция в большей степени влияет на активность фагоцитоза и способность нейтрофилов к окислительному взрыву, лимфопролиферативные процессы в селезенке и синтез Ig в процессе реализации гуморального иммунного ответа; синтез провоспалительных цитокинов на стадии разрешения ГЗТ. Действие этаноловой фракции в большей степени направлено на интенсивность фагоцитоза и угнетение пролиферации антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов на стадии сенсibilизации ГЗТ. Исследуемые фракции не оказывают иммунокорректирующего действия на пролиферацию АОК селезенки, которое проявляет цельная субстанция. Поэтому считаем, что в качестве ФС для разработки ЛП с иммуотропным и противомикробным эффектами целесообразнее использовать цельное извлечение С-1 (субстанцию Сg).

В **главе 5** приведены показатели протективного действия субстанции Сg при инфекционном процессе, а также результаты оценки острой и хронической токсичности.

При развитии экспериментальной стафилококковой генерализованной инфекции субстанция Сg при введении животным по 2-м схемам (до заражения – профилактическим курсом и непосредственно сразу после заражения – лечебным курсом) способствовала 100 %-ной выживаемости животных экспериментальных групп в сравнении с контролем (падеж 24,8 %). Кроме того, применение Сg сокращало длительность инфекционного процесса на 25 % (при профилактическом курсе) и существенно ускорял элиминацию возбудителя из внутренних органов (печени, селезенки и почек) (рисунок 3).

Механизм протективного действия Сg при стафилококковой инфекции заключался в бактерицидном и бактериостатическом действии, сдерживающем



колонизацию возбудителем тканей макроорганизма; стимуляции пролиферации гранулоцитов в инкубационном периоде (при профилактическом и лечебном курсе), на стадии выраженных кинических проявлений (при лечебном курсе) и на стадии выздоровления (при профилактическом курсе) без выраженного нарушения лейкопоза (отсутствие выраженного ядерного сдвига и дегенеративных форм нейтрофилов) (таблица 8).

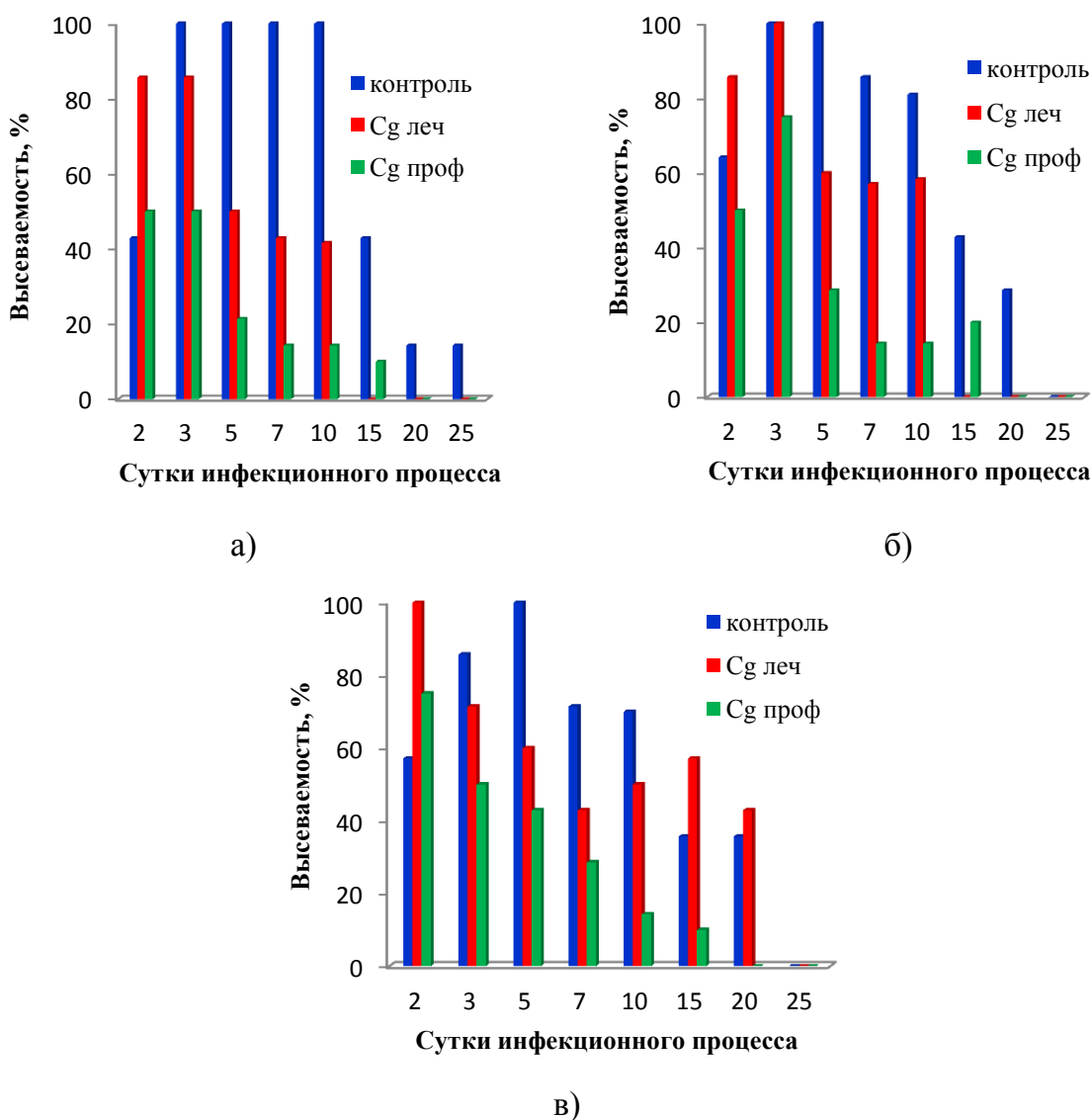


Рисунок 3 – Динамика высеваемости возбудителя из внутренних органов животных: а) из печени, б) из селезенки, в) из почек (Cg леч. – введение субстанции Cg лечебным курсом, Cg проф. – профилактическим курсом).

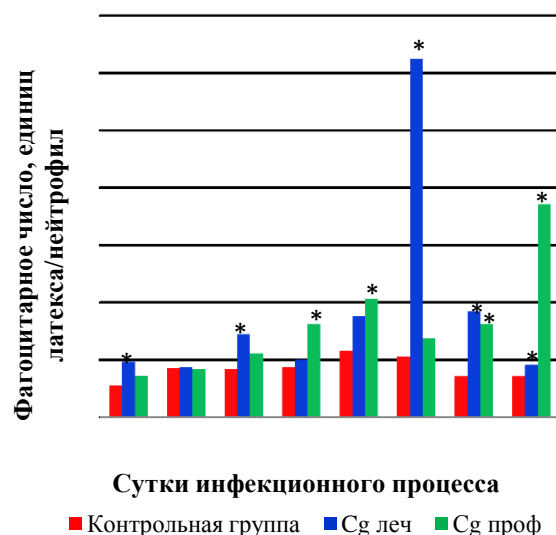
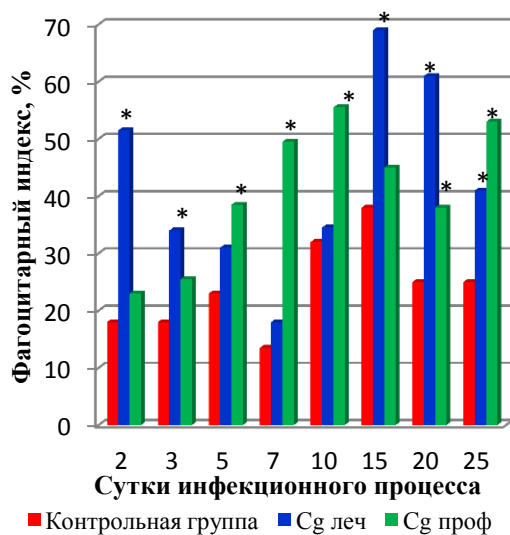
Кроме того, субстанция Cg стимулировала активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов в начале и в конце инфекционного процесса (при лечебном курсе), в разгар инфекционного процесса и на стадии выздоровления (при профилактическом курсе) (рисунок 4). А также увеличивала синтез

специфических антител-агглютининов в более ранние сроки (при лечебном курсе) и в большем титре (при лечебном и профилактическом курсе), чем в контрольной группе.

Таблица 8 – Динамика изменения абсолютного числа лейкоцитов периферической крови под влиянием Сg, Медиана (25%÷75%), n=8-9

Сутки инф процесса	Абсолютное число лейкоцитов периферической крови, *10 <sup>9</sup> /л		
	Контрольная группа	1-ая экспериментальная (Сg лечебный курс)	2-ая экспериментальная (Сg профилактический курс)
2	7,15 (6,31÷11,04)	11,00 (7,95÷13,35)*	10,00 (8,50÷10,83)
3	6,65 (4,71÷9,83)	16,05 (11,63÷18,27)*	9,70 (8,70-11,00)*
5	12,68 (9,66÷16,41)	17,25 (11,95÷24,90)	14,73 (11,61÷15,86)
7	10,15 (7,33÷11,68)	12,35 (11,30÷13,85)*	8,88 (7,86÷12,73)
10	5,80 (3,55÷8,65)	11,88 (9,20÷12,86)*	10,85 (8,51÷12,85)*
15	7,90 (6,64÷9,39)	9,075 (6,78÷11,10)	9,85 (9,31÷10,64)*
20	8,28 (7,05÷9,69)	7,05 (6,26÷12,31)	6,63 (5,93÷7,80)*
25	5,10 (4,35÷10,20)	8,90 (5,85÷9,15)	9,25 (8,90-10,10)

Примечание – \*- различие с показателями контрольной группы достоверно при p≤0,05.



а)

б)

Рисунок 4 - Влияние субстанции Сg на активность (а) и интенсивность (б) фагоцитоза

(Сg леч. – введение препарата Сg лечебным курсом, Сg проф. – профилактическим курсом, \* помечены значения, достоверно различающиеся со значениями контрольной группы)

Специфические антитела-агглютинины к *S. aureus* появлялись в цельной сыворотке крови животных контрольной группы на 5-ые сутки инфекционного процесса, затем их титр постепенно нарастал и на 25 сутки составил 1:8192 ( $\lg_2 T - 13,7$ ). У животных, получавших Сg профилактическим курсом, антитела появились также на 5-е сутки, но на всем протяжении эксперимента их титр достоверно превышал показатели контрольной группы. У животных, получавших Сg лечебным курсом, специфические антитела были обнаружены на 3-и сутки после заражения, на 5-е сутки их титр составил 1:2 ( $\lg_2 T - 1,0$ ) и далее на всем протяжении инфекционного процесса был достоверно выше показателей контрольной группы.

Перечисленные эффекты субстанции Сg могут играть основную роль в защите от стафилококковой инфекции, что подтверждается рядом фактов, описанных в литературе. Большинство стафилококковых инфекций являются эндогенными и связаны с попаданием бактерий на травмированные поверхности (Пономаренко С.В., 2013). Поэтому стимуляция пролиферации нейтрофильных гранулоцитов в течение инкубационного периода под влиянием Сg будет способствовать уменьшению колонизации возбудителем тканей в месте входных ворот. Установлено, что при гнойно-воспалительных процессах снижается поглотительная способность нейтрофилов (Сергеева И.Е., Борисенко А.В., 2010). Поэтому стимуляция фагоцитоза субстанцией Сg способствует ускорению процесса элиминации патогена. Опсонизация антителами бактериальных клеток приводит к значительной активации фагоцитоза стафилококков (Слободчикова С.В. и др., 2011), следовательно, стимулирующий синтез антител под влиянием субстанции Сg будет усиливать ее стимулирующее влияние на фагоцитоз. Доказано, что подъем уровня ИЛ-1 в ранние сроки стафилококковой инфекции в опыте *in vivo* приводит к более быстрой элиминации возбудителя и сокращению сроков выздоровления (Захарова Л.Н. и др., 2010). Этот эффект Сg может лежать в основе его протективного действия при стафилококковой инфекции.

При изучении новых ЛС, в том числе растительного происхождения, необходимым условием является изучение их безопасности. С этой целью было проведено исследование острой и хронической токсичности субстанции Сg на неинбредных белых и инбредных мышах с учетом половых различий. При однократном (в дозах 1,0-5,0 г/кг) и длительном (14 дней, в дозах 1,0-2,0 г/кг)

пероральном введении субстанции Сg падеж животных во всех вариантах эксперимента отсутствовал, LD<sub>50</sub> в нашем исследовании определить не удалось. Поэтому субстанцию Сg следует относить к веществам IV класса опасности (малотоксичные) (Саноцкий М.В., Уланова П., 1970; ГОСТ 12.1.007-76). Субстанция Сg при пероральном однократном и длительном введении не оказывала общетоксического действия на мышей.

При однократном введении Сg гематологические показатели периферической крови в процессе эксперимента изменялись незначительно, в пределах физиологической нормы (Западнюк И.П. и др., 1983). При длительном введении Сg неинбредным мышам отмечали тенденцию к увеличению абсолютного числа лейкоцитов и эритроцитов. У инбредных мышей произошло достоверное (в сравнении с контрольной группой) увеличение абсолютного числа лейкоцитов (у самок) и эритроцитов (у самок и самцов). Морфологический состав лейкоцитов у животных, получавших Сg, не изменялся.

При однократном и длительном введении Сg не вызывала патологических и специфических деструктивных изменений в органах и тканях животных. Индексы массы внутренних органов животных контрольных и экспериментальных групп при оценке острой токсичности достоверно не различались. При оценке хронической токсичности субстанции Сg через 2 месяца наблюдения было отмечено достоверное увеличение индекса массы печени и селезенки ( $p=0,000$ ;  $p=0,002$  соответственно) у неинбредных мышей (самцов) и уменьшение индекса массы печени ( $p=0,004$ ) у инбредных мышей (самцов). При гистологическом исследовании органов существенных изменений общей гистоархитектоники органа, фиброзного или жирового изменения органа не установили.

При проведении теста «Открытое поле» установили, что однократное введение Сg (2,0 г/кг) самкам инбредных мышей приводит к достоверному увеличению числа эпизодов большого груминга, самцам – к снижению эмоциональности, оцениваемой по числу болюсов. При курсовом введении субстанции Сg у самок инбредных мышей статистически достоверно ( $p=0,002$ ) снизились число больших стоек с 4,0 (3,0÷8,5) до 0,0 (0,0÷1,75) эпизодов и горизонтальная двигательная активность по периферии с 13,5 (8,5÷17,8) до 2,5 (1,0÷7,3) пересеченных секторов. И произошло достоверное ( $p=0,004$ ) увеличение

числа эпизодов длительного груминга с 0,0 (0,0÷0,0) до 1,0 (1,0÷2,0) эпизодов. У самцов также отмечалась подобная тенденция. Такие изменения поведенческих реакций у животных могут свидетельствовать о наличии седативной активности (Быстрова М.Н, 2011).

В главе 6 приведены результаты исследования химического состава и биологических особенностей *Cg*. Выход ЭМ из образцов сырья, собранного в разных экологических условиях, составил 1,469-1,658 %. Сырье *Cg*, интродуцированной на Украине и в Польше, было ранее исследовано на содержание ЭМ, выход которого в условиях интродукции значительно снижался (Olsłowska O., Furmanova M., 1993). По нашим данным, выход ЭМ из сырья, интродуцированного в условиях экологического оптимума, был сопоставим с таковым для дикорастущего сырья (1,480 %). Содержание фенолкарбоновых кислот в сырье *Cg* составило от 2,235 до 2,650% (в сырье интродуцированного растения – 2,490 %). Эти показатели можно использовать для стандартизации сырья. Для определения подлинности сырья *Cg* можно рекомендовать обнаружение эвгенола в этаноловом извлечении (96 %-ным спиртом этиловым) из измельченного сырья методом ТСХ в системе «гексан-этилацетат» (17:3). После проявления хроматограммы раствором ванилина в концентрированной кислоте серной обнаруживаются зоны адсорбции эвгенола фиолетового или красно-фиолетового цвета с  $R_f$  около 0,65.

В надземной и подземной части *Cg* хроматографическими методами были обнаружены 7 веществ кумариновой природы и 22 фенольных соединения (11 из них после кислотного гидролиза). По времени удерживания стандартных растворов и УФ-спектрам 5 соединений были идентифицированы как флавонолактоны мирицетина, кверцетина и кемпферола; гликозиды кверцетина и кемпферола. Из фенолкарбоновых кислот идентифицирована галловая кислота. Спектральные данные 3 неидентифицированных компонентов позволяют отнести их к фенолкарбоновым кислотам. Имеются некоторые отличия в компонентном составе надземной и подземной части растения. В корневищах с корнями отмечено 16 из 22 обнаруженных фенольных соединений, в надземной части растения – более высокое содержание галловой кислоты, кверцетина и кемпферола.

В составе извлечений С-1 и С-2 методом ВЭЖХ было идентифицировано 7 соединений фенольной природы: фенолкарбоновые кислоты (галловая, м-кумаровая, хлорогеновая, эллаговая), флавоноиды (кверцетин, кемпферол), кумарин. С-1 содержит большее количество фенолкарбоновых кислот и меньше – флавоноидов (таблица 9).

Таблица 9 – Характеристика и содержание фенольных соединений извлечений Сg

Соединение	Время удерживания (t <sub>R</sub> ), мин	Спектральные данные λ <sub>max</sub> , нм	Количественное содержание, % от массы высушенного извлечения	
			С-1	С-2
Галловая кислота	1,55	220, 280	15,85	18,41
м-Кумаровая кислота	1,86	235, 320	8,68	5,66
Хлорогеновая кислота	3,19	240, 325	1,87	1,27
Кумарин	12,08	215, 275	0,54	1,09
Эллаговая кислота	21,60	255, 370	19,13	8,21
Кверцетин	40,26	256, 370	0,87	1,20
Кемпферол	47,39	–	0,98	3,82

Примечание – с целью предварительной ориентировочной оценки количественного содержания фенольных соединений в извлечениях Сg определяли в одной повторности

Преобладающими компонентами суммы фенольных соединений извлечений С-1 и С-2 являются фенолокислоты, их суммарное содержание больше в извлечении 40 %-ным этанолом. Хлорогеновая и м-кумаровая кислоты, относящиеся к группе фенилпропаноидов (производных коричных кислот), также преобладают в извлечении С-1. Именно эти БАС, по-видимому, обеспечивают иммунокорригирующее действие извлечений Сg, как и сырья *E. purpurea* (Куркин В.А. и др., 2005; Куркин В.А., 2012). Кроме того, за иммуностимулирующую активность изучаемых комплексов БАС могут отвечать галловая и эллаговая кислоты (составляющие 15-19 % от массы извлечений). Иммуностимулирующая активность эллаговой кислоты в составе растительного сырья установлена (Drozd J., Anuszevska E., 2005). Активность БАС растительного происхождения многие авторы также объясняют их антиоксидантными свойствами, присущими фенольным соединениям (Железнова А.Д. и др., 2009; Ильина И.Г. и др., 2013; Масная Н.В. и др., 2013; Хобракова В.Б., 2012).

Методом ВЭЖХ был изучен химический состав этаноловой и водной фракций субстанции Сg (таблица 10).

Таблица 10 – Характеристика и содержание фенольных соединений фракций субстанции Сg

Соединение	Время удерживания ( $t_R$ ), мин	Спектральные данные $\lambda_{max}$ , нм	Степень извлечения фенольных соединений (% от общего содержания в сухой субстанции Сg)	
			водной	этаноловой
<i>До кислотного гидролиза</i>				
1. Галловая кислота	1,55	220, 280	53,67	18,27
2. <i>m</i> -Кумаровая кислота	1,82	235, 320	43,19	36,41
3. Ванилиновая кислота	4,83	210, 250, 290	19,54	8,42
4. Соединение I	6,53	260, 330	31,65	21,46
5. <i>n</i> -Кумаровая кислота	8,39	210, 290, 310	12,00	6,13
6. Эллаговая кислота	21,60	255, 370	61,78	21,92
7. Соединение II	32,18	290, 340	81,00	19,00
8. Соединение III	36,90	255, 290	11,86	25,43
9. Кверцетин	40,25	256, 370	11,64	6,30
10. Соединение IV	44,45	220, 370	8,77	13,08
11. Кемпферол	47,49	250, 360	11,13	16,88
12. Соединение V	49,20	220, 370	17,68	3,92
13. Соединение VI	51,80	255, 370	6,10	15,67
<i>После кислотного гидролиза</i>				
14. Соединение VII	1,40	220, 280	26,16	35,19
15. Протокатеховая ки-та	1,72	210, 240, 280	25,83	21,86
16. <i>n</i> -Кумаровая кислота,	2,50	210, 223, 310	6,92	27,24
17. Эллаговая кислота	3,83	255, 370	9,75	21,91
18. Соединение VIII	5,89	225, 350	6,54	29,25
19. Кверцетин	6,59	256, 370	6,55	34,18
20. Соединение IX	9,55	220, 270	5,90	36,93
21. Кемпферол	11,45	255, 365	4,18	26,34
22. Соединение X	16,46	250, 370	6,44	34,49
23. 20-гидроксиэкдизон	3,35	220, 270, 325	100,00	–

Примечания:

1. «–» данное соединение в фракции не обнаружено,
2. с целью предварительной ориентировочной оценки количественное содержание фенольных соединений в фракциях субстанции Сg определяли в одной повторности.

Важной находкой явилось обнаружение в водной фракции субстанции Сg после кислотного гидролиза 20-гидроксиэкдизона. Это соединение также может быть носителем иммуотропных свойств растения, так как существуют данные о влиянии 20-гидроксиэкдизона на фагоцитарную активность лейкоцитов крови животных, исследователи отмечают данное соединение как перспективное для использования в качестве иммуностимулятора (Репина Е.Н. и др., 2004; Шахмурова Г.А. и др., 2010). В водную фракцию в значительной степени переходили соединение II (81,0 %), эллаговая (61,78), галловая (53,67) и *m*-

кумаровая кислоты (43,19%), 20-гидроксиэкдизон (100%); в этанольную фракцию – соединение III (25,43%) кемпферол (16,88%), *m*-кумаровая кислота (36,41%). В целом, в составе изученных фракций, как и в цельной субстанции *Cg*, преобладают фенолокислоты (в том числе простые фенилпропаноиды – производные коричных кислот). Эти БАС, скорее всего, отвечают за фармакологическую активность разработанной фармацевтической субстанции *Cg*.

При введении в медицинскую практику нового ЛРС обязательно исследование биологических особенностей растения-производителя. Так как *C. geoides* произрастает на ограниченной территории Южной Сибири, эти вопросы были изучены детально. На территории Хакасии в было установлено более 30 местонахождений вида. Это травянистое короткокорневищное растение с эпигеогенным корневищем; летне-зимнезеленое с весенне-раннелетним ритмом цветения и эфемероидным типом развития генеративных побегов. Онтогенез особи полный, сложный с вегетативным размножением в середине жизни (в зрелом и старом генеративном состояниях) и образованием неглубоко омоложенных рамет. Поливариантность развития (морфологическая, ритмологическая и по темпам развития) определяет пластичность вида и существование его в разных эколого-ценотических условиях.

На территории Республики Хакасия состояние ЦП вида является стабильным, что обеспечивается путем поливариантности развития вида и его лабильностью в разных эколого-ценотических условиях. Базовый спектр ЦП – центрированный, с локальными подъемами на виргинильном и субсенильном онтогенетических состояниях.

В результате изучения анатомического строения *C. geoides* установили, что ЭМ локализуется в стеблях, листьях, цветках, корневище, корнях и семенах растения в трех типах терпеноидсодержащих структур: в специализированной эфирноносной ткани (под покровными тканями корневищ, корней, стеблей и семян); в неспециализированных клетках губчатого мезофилла листьев, коровой части и сердцевины корневищ с корнями; в головчатых железистых волосках на эпидерме листьев, чашелистиков, стеблей. Для цельного и измельченного сырья *C. geoides* установлены характерные специфические макро- и микроскопические признаки, от возможных примесей цельное и измельченное сырье можно отличить по характеру



опушения и структуре эфирноносной ткани. В качестве сырья нового лекарственного растения *C. geoides* целесообразно использовать собранные с июля по август в период вегетации после плодоношения, тщательно очищенные от земли и высушенные корневища с корнями и траву (всю надземную часть).

Метод модельных экземпляров наиболее подходит для оценки ресурсных характеристик исследуемого вида, как наиболее точно учитывающий его биологические особенности. Плотность запаса сырья, определенная методом модельных экземпляров, в зависимости от эколого-ценотических условий колеблется от 0,218 до 2,238 кг/м<sup>2</sup>; возможный ежегодный объем заготовки, составляет в среднем 35,45 кг/1000 м<sup>2</sup>. Заготовка сырья наиболее целесообразна в пределах разреженных лиственничных лесов и луговых степей, где ЦП растения наиболее стабильны и образуются пригодные для промышленного сбора заросли с высокими значениями плотности запаса сырья.

## ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга извлечений из сырья 6 видов эфирномасличных растений, не используемых в медицинской практике, выявлено выраженное иммуностимулирующее действие биологически активных соединений *Coluria geoides* (*Rosaceae*), направленное на неспецифическую резистентность, фагоцитарную активность нейтрофилов, лимфопрлиферативные процессы (*in vivo*) и цитокинпродуцирующую активность мононуклеаров (*in vitro*).
2. Установлено выраженное противомикробное действие (сопоставимое с действием эфирного масла *Orygamum vulgare* и *Acorus calamus*) эфирных масел 3 видов растений (*N. sibirica*, *T. petraeus*, *C. geoides*), этаноловых извлечений 2 видов растений (*C. geoides*, *Z. clinopodioides*). Извлечение из сырья *C. geoides*, полученное методом перколяции 40 %-ным спиртом этиловым, обладает противомикробным действием в отношении грамположительных бактерий (бактерицидные дозы 3,6-7,1 мг/мл) и менее выраженным (бактерицидная доза 14,2 мг/мл) – в отношении грамотрицательных бактерий.
3. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* извлечения из *C. geoides* проявляют иммуностимулирующее и иммунокорригирующее действие (при экспериментальном иммунодефиците), сопоставимое с действием настойки эхинацеи. По способности стимулировать продукцию провоспалительных

цитокинов и синтез иммуноглобулинов; иммунокорректирующему действию (направленному на пролиферацию антителообразующих клеток селезенки и синтез иммуноглобулинов в процессе гуморального иммунного ответа) – превосходящее действие настойки эхинацеи.

4. В качестве фармацевтической субстанции для создания лекарственных препаратов целесообразно использовать извлечение из подземной и надземной части растения, полученное методом перколяции 40 %-ным спиртом этиловым с последующим высушиванием. Возможным механизмом действия данного комплекса биологически активных соединений является стимуляция пролиферации иммунокомпетентных клеток и синтеза провоспалительных цитокинов.
5. Установлено протективное действие разработанной фармацевтической субстанции из сырья *C. geoides* при экспериментальной стафилококковой инфекции, выражающееся в увеличении выживаемости животных, ускорении элиминации возбудителя, стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов и синтеза специфических антител-агглютининов. Протективное действие извлечения выражено при введении субстанции профилактическим и лечебным курсом.
6. На основании изучения острой и хронической токсичности разработанная фармацевтическая субстанция из сырья *C. geoides* отнесена, согласно классификации И. В. Саноцкого (1970), к классу малотоксичных. LD<sub>50</sub> составляет более 5,0 г/кг.
7. В сырье *C. geoides* установлено наличие эфирного масла (с доминирующим компонентом – эвгенолом) и 22 фенольных соединений: флавоноидов (идентифицированы кверцетин, кемпферол, мирицетин и их гликозиды), кумаринов, фенолкарбоновых кислот (идентифицированы м-кумаровая, галловая, эллаговая, хлорогеновая). В составе извлечений *C. geoides* преобладают гидроксикоричные кислоты.
8. Действующими веществами разработанной фармацевтической субстанции являются простые фенилпропаноиды (фенилпропаны и производные коричных кислот), нецелесообразность их выделения доказана анализом выраженности иммуностропных эффектов фракций извлечения. Фармацевтическую субстанцию

следует стандартизовать по выходу *m*-кумаровой кислоты (не менее 8,5 %, от массы сухого извлечения).

9. В целях рационального использования растительного сырья *C. geoides* для получения фармацевтической субстанции целесообразно заготавливать всю биомассу растения. Состояние природных ценопопуляций *C. geoides* на территории Республики Хакасия является устойчивым, ресурсные характеристики вида достаточны для заготовки. На лекарственное растительное сырье разработана нормативно-техническая документация (проект ВФС).

### НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанная фармацевтическая субстанция, представляющая собой извлечение из корневищ с корнями и травы *C. geoides* (*Rosaceae*) 40 %-ным спиртом этиловым, рекомендуется в качестве основы для создания безопасных и эффективных ЛП с иммуностимулирующим, иммунокорректирующим и противомикробным действием. Рекомендуется также дальнейшее доклиническое исследование иммуотропных и противомикробных свойств суммарных извлечений из травы *Nepeta sibirica* (*Lamiaceae*) и *Prunella vulgaris* (*Lamiaceae*).

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### *Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ*

1. Леонова, Т.В. Онтогенетическая структура популяций *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) в разных эколого-ценотических условиях в Хакасии / Т.В. Леонова, **С.В. Водолазова**, В.А. Черемушкина // Растительные ресурсы. – Т.46 – Вып.2. – 2010. – С.24-32.
2. Леонова, Т. В. Эколого-ценотическая характеристика и онтогенез *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) в Хакасии / Т.В. Леонова, **С.В. Водолазова**, В.А. Черемушкина // Ботанический журнал. – 2010. – Т. 95. – № 1. – С. 48-59.
3. **Водолазова, С.В.** Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С.В. Водолазова, М.А. Мяделец, М.Р. Карпова, Ю.В. Саранчина // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – №2. – Вып. 2. – С.54-58.
4. **Водолазова, С.В.** Влияние фитопрепаратов из сырья Колюрии гравилатовидной на цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов периферической крови / С.В. Водолазова, Ю.В. Саранчина, М.Р. Карпова // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т.2. – №1-2. – С.563-564.
5. **Дутова, С.В.** Протективное действие настойки *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на модели генерализованной стафилококковой инфекции / С.В. Дутова, Н.П. Неделькина, М.Р. Карпова, В.Ю. Чумаков // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6(14). – № 3 (1). – С.74-75.
6. Мяделец, М.А. Исследование химического состава эфирных масел *Nepeta sibirica* L., *Thymus petraeus* L. и *Schizonepeta multifida* L., произрастающих на территории Республики Хакасия / М.А. Мяделец, Д.В. Домрачев, **С.В. Водолазова** // Химия растительного сырья. –2012. – №4.

7. Мяделец, М.А. Хроматографическое изучение фенольных соединений *Coluria geoides* (*Rosaceae*) / М.А. Мяделец, **С.В. Дутова** // Растительный мир Азиатской России. – 2012. – № 2(10). – С. 43-48.
8. **Дутова, С.В.** Исследование токсичности настойки Колюрии гравилатовидной / С.В. Дутова, В.Ю. Чумаков, Н.П. Неделькина // Фундаментальные исследования. – № 9. – Ч. 2. – 2013. – С. 277-280.
9. Неделькина, Н. П. Профилактическое действие препарата из сырья *Coluria geoides* (*Rosaceae*) при стафилококковой инфекции / Н.П. Неделькина, **С.В. Дутова**, Ю.В. Ростовцева, М.Р. Карпова // Инфекция и иммунитет. – №1. – Т. 4. – 2014. – С.80-81.
10. **Дутова, С.В.** Острая и хроническая токсичность настойки *Coluria geoides* (*Rosaceae*) / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/117-13408>.
11. **Дутова, С.В.** Влияние препаратов *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на клеточный иммунитет / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17). – № 2 (1). – С.51-53.
12. **Дутова, С.В.** Исследование биологически активных веществ сухого экстракта *Coluria geoides* (*Rosaceae*), стимулирующих клеточный иммунный ответ / С.В. Дутова, Н.П. Неделькина, М.А. Мяделец и др. // Известия Самарского научного центра Российской Академии наук. – 2014. Т.16. – № 5 (4). – С. 1212-1215.
13. Мяделец, М.А., Фенольные соединения сухих экстрактов *Coluria geoides* (*Rosaceae*) / М.А. Мяделец, **С.В. Дутова** // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. –2014. – №9. – С. 60-61.
14. **Дутова, С.В.** Доклиническое исследование иммунокорректирующего действия суммарных препаратов *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*) / С. В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец, Н.В. Масная, Е.Ю. Шерстобоев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – №3. – С. 22-26.
15. **Дутова, С.В.** Иммуностимулирующие свойства некоторых сибирских растений / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Фармация. – 2015. – №2. – С. 51-53.
16. **Дутова, С.В.** Иммуностимулирующее действие экстракта *Coluria geoides* (*Rosaceae*) при генерализованной стафилококковой инфекции / С.В. Дутова, Н.П. Неделькина, М.Р. Карпова, В.Ю. Чумаков, М.А. Мяделец // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9.(18) – № 2 (1) – С. 15-17.
17. **Дутова, С.В.** Доклиническое исследование влияния экстракта *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на синтез иммуноглобулинов / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – С. 260-261.

#### **Монографии**

18. Лекарственные растения Хакасии: монография / Под. ред. **С.В. Водолазовой**. – Абакан: изд-во ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», 2011. – 164с.

#### **Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференций**

19. **Водолазова, С.В.** Лекарственные растения Хакасии и перспективы их использования / С.В. Водолазова // Экология Южной Сибири – 2000 год: Мат. 1-ой Южно-сибирской регион. научн. конф. студентов и молодых учёных. – Абакан: изд-во ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 1997. – С.25-26.
20. **Водолазова, С.В.** Перспективы изучения губоцветных флоры Хакасии / С.В. Водолазова // Экология Южной Сибири – 2000 год: Мат. 2-ой Южно-сибирской регион. научн. конф. студентов и молодых учёных. – Абакан: изд-во ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 1998. – С.24-25.
21. **Водолазова, С.В.** Перспективы изучения лекарственных растений Хакасии, обладающих антимикробными свойствами / С.В. Водолазова // Природные условия,

- история и культура Западной Монголии и сопредельных регионов: Тезисы докладов IV Межд. научн. конф. – Томск: изд-во ТГУ, 1999. – С.19.
22. **Водолазова, С.В.** Изучение антимикробных свойств и возможностей интродукции колюрии гравилатовидной / С.В. Водолазова, С.Ю. Табаргина // Экология Южной Сибири – 2000 год: Мат. Южно-Сибирской межд. научн. конф. студентов и молодых учёных. – Абакан: изд-во ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2000. – С.84-86.
  23. Кузнецова, Н.Ю. Биоразнообразие эфиромасличных растений Хакасии / Н.Ю. Кузнецова, **С.В. Водолазова** // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий: Мат. VI межд. научн. школы-конф. студентов и молодых учёных. – Абакан, 2002. – С.18-19.
  24. **Водолазова, С.В.** Лекарственный потенциал флоры Хакасии / С.В. Водолазова // Биоразнообразие и пространственная организация растительного мира Сибири, методы изучения и охраны: Мат. Всеросс. конф. (Новосибирск, 25-27 октября 2005г.). – Новосибирск: ЦСБС СО РАН, 2005. – С.32-33.
  25. **Водолазова, С.В.** Итоги изучения лекарственной флоры Хакасии / С.В. Водолазова // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. – Выпуск №9. – Абакан: Изд-во ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2005. – Т.1. – С.3-6.
  26. **Водолазова, С.В.** Антимикробные свойства и химический состав эфирного масла *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. / С.В. Водолазова, А.В. Ткачев // Мат. I (IX) Межд. конф. молодых ботаников в Санкт-Петербурге (21-26 мая 2006г.). – СПб: Изд-во ГЭТУ, 2006. – С.141.
  27. Леонова, Т.В. Возрастная структура и классификация ценопопуляций *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. / Т.В. Леонова, **С.В. Водолазова** // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. – Выпуск №10. – Абакан: Изд-во ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2006. – Т.1. – С.26-27.
  28. Мяделец, М.А. Антимикробная активность сухих экстрактов и эфирных масел из надземной части видов семейства *Lamiaceae* L. / М.А. Мяделец, **С.В. Водолазова** // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы: Мат. межд. науч. конф, посв. 200-летию Казанской бот. школы. – Ч. 2. - Казань, 2006. – С. 74-76.
  29. **Водолазова, С.В.** Онтогенез *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. / С.В. Водолазова, Т. В. Леонова, В.А. Черемушкина // Перспективы развития и проблемы современной ботаники: Мат. I (III) Всеросс. молод. научно-практ. конф. ботаников в Новосибирске (Новосибирск, 17-21 октября 2007г.). – Новосибирск: изд-во СО РАН, 2007. – С.57-59.
  30. Мухина, Е.С. Оптимизация условий препаративного выделения и разделения флавоноидов колюрии гравилатовидной (*Coluia geoides* (Pall.) Ledeb.) / Е.С. Мухина, **С.В. Водолазова** // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. – 2010. – Вып. 14. – Т.1. – С.39-41.
  31. **Водолазова, С.В.** Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из сырья некоторых лекарственных растений флоры Хакасии / С.В. Водолазова, Е.Б. Мадистова, М.А. Мяделец и др // Медицинский академический журнал. – Т.10. – Вып.5. – 2010. – С.155.
  32. **Водолазова, С.В.** Возможности фитотерапии при коррекции иммунодефицитных состояний / С.В. Водолазова, Ю.В. Саранчина // Актуальные проблемы медицины: Мат. 13-ой межрег. научно-практ. конф. с межд. участием (Абакан, 4-5 мая 2010г.). – Абакан: изд-во ГОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2010. – С.194-197.
  33. **Водолазова, С.В.** Влияние препаратов колюрии гравилатовидной на фагоцитарную активность и цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов периферической крови / С.В. Водолазова, Е.С. Агеева, Ю.В. Саранчина // Дни иммунологии в Сибири: Мат. Всероссийской научно-практ. конф. с межд. участием (Абакан, 27-28 апреля 2011г.). – Абакан: Изд-во ГОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2011. – С.192-194.
  34. **Водолазова, С.В.** Противомикробные и иммуностимулирующие свойства суммарных фитопрепаратов из сырья колюрии гравилатовидной / С.В. Водолазова,

- М.А. Мяделец, Ю.В. Саранчина // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. – Вып. 15. – 2011. – Т. II. – С.40-42.
35. **Дутова, С.В.** Антимикробное и иммуностимулирующее действие настойки *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на модели стафилококкового пиелонефрита у мышей / С.В. Дутова, Н.П. Неделькина, М.Р. Карпова, В.Ю. Чумаков // Актуальные проблемы медицины: Мат. 15-й Межрегион. научно-практ. конф. и с межд. участием (Абакан, 25-26 апреля 2012г.) – Абакан: Изд-во ФГБОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова», 2012 – С.112-116.
36. Мяделец, М.А. Фенольные соединения *Coluria geoides* (*Rosaceae*) / М.А. Мяделец, **С.В. Дутова** // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: Мат. докл. VIII межд. симпозиума (Москва, 2-5 октября 2012). – М.: ИФР РАН; РУДН, 2012. – С.616-620.
37. Неделькина, Н.П. Проявление антибактериальных свойств настойки колюрии гравилатовидной на модели экспериментального пиелонефрита / Н.П. Неделькина, **С.В. Дутова** // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. – Выпуск 16. – в 2 т. – Т II., Абакан, 2012. – С.123-124.
38. **Дутова, С.В.** Возможности использования фитопрепаратов некоторых эфиромасличных растений в качестве иммуностимуляторов / С.В. Дутова, Д.А. Березина, Ю.В. Саранчина // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Мат. V Междунар. научно-практ. конф. (Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013г) – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2013. – С.343-344.
39. **Дутова, С.В.** Иммунокорректирующее действие препаратов колюрии гравилатовидной при цитостатической болезни / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Дни иммунологии в Сибири: Мат. Всеросс. научно-практ. конф. – Красноярск, 2013. – С.54-55.
40. **Дутова, С.В.** Иммуностимулирующие свойства эфиромасличных растений, содержащих фенилпропаноиды / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Мат. Шестой Всеросс. научно-практ. конф. (Новосибирск, 16-17 апреля 2013г.). – Новосибирск: Редакционно-издательский центр НГУ, 2013. – С.46-47.
41. Неделькина, Н.П. Влияние фитопрепарата *Coluria geoides* на иммунный ответ при стафилококковой инфекции / Н.П. Неделькина, **С.В. Дутова**, Ю.В. Ростовцева // Современная микробиология и биотехнология глазами молодых исследователей: мат. Всеросс. научн. конф. (г. Томск, 2-4 апреля 2014г.). – Томск: Издательский дом Томского государственного университета, 2014. – С.76-79.
42. Мяделец, М.А. Фенольные соединения сухих экстрактов *Coluria geoides* (*Rosaceae*) / М.А. Мяделец, **С.В. Дутова** // От растения к препарату: традиции и современность: Сборник научных трудов Всеросс. конф. с межд. участием. – Москва. – 2014. С.104-106.
43. **Дутова, С.В.** Изучение протективных свойств нового фитопрепарата при стафилококковой инфекции / С.В. Дутова, Н.П. Неделькина, М.Р. Карпова и др. // «Человек и лекарство»: Тез. XXI Российского Национального конгресса (г. Москва, 7-11 апреля 2014г.). – С.237-238.
44. **Дутова, С.В.** *Coluria geoides* (*Rosaceae*) – новый источник иммунотропных препаратов / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Создание конкурентноспособных лекарственных средств – приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки: Мат. научно-практ. конф. с межд. участием (Пермь, 1-3 декабря 2014г.). – Вестник Пермской гос. фарм. Академии. – 2014. – №14. – С.49-52.
45. **Дутова С.В.** Влияние экстрактов *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Перспективы внедрения инновационных технологий в фармации:

- Сборник мат. межд. научно-практ. конф. (Орехово-Зуево, 24-25 ноября 2014г.). – МГОГИ, 2014. – С.15-18.
46. **Дутова, С.В.** Влияние БАС *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на гуморальный иммунный ответ / С.В. Дутова, Д.С. Дихтяров, Д.Р. Ауходеев и др. // Фармация и фармакология. – 2014. – № 6 (7). – С.66-74.
  47. **Дутова, С.В.** Влияние БАС *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на клеточный иммунный ответ / С.В. Дутова, Ю.В. Ростовцева, М. Р. Карпова и др. // Фармация и фармакология. – 2014. – № 6 (7). – С.74-77.
  48. Ауходеев, Д.Р. Оценка возможности использования БАВ *Coluria geoides* при инфекционных заболеваниях в опыте *in vivo* / Д.Р. Ауходеев, **С.В. Дутова** // Наука и общество: Мат. восьмой Всеросс. научн. конф. школьников и студентов с межд. участием (Абакан, 27-28 ноября 2014г.). – Абакан: изд-во ФГБОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2014. – С.62-63.
  49. Дихтяров, Д.С. Влияние БАВ *Coluria geoides* на пролиферацию антителообразующих клеток селезенки в опыте *in vivo* / Д.С. Дихтяров, **С.В. Дутова** // Наука и общество: Мат. восьмой Всеросс. научн. конф. школьников и студентов с межд. участием (Абакан, 27-28 ноября 2014г.). – Абакан: изд-во ФГБОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2014. – С.66-66.
  50. Манашева, Д.И. Влияние препарата *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на поведенческие реакции мышей при тестировании в «Открытом поле» / Д. И. Манашева, Э.З. Исмаилова, А.А. Рабиева, **С.В. Дутова** // Наука и общество: Мат. восьмой Всеросс. научн. конф. школьников и студентов с межд. участием (Абакан, 27-28 ноября 2014г.). – Абакан: изд-во ФГБОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2014. – С.71-72.
  51. Ростовцева, Ю.В. Влияние различных фракций экстракта *Coluria geoides* на пролиферацию иммунокомпетентных клеток в опыте *in vivo* / Ю.В. Ростовцева, **С.В. Дутова** // Наука и общество: Мат. восьмой Всеросс. научн. конф. школьников и студентов с межд. участием (Абакан, 27-28 ноября 2014г.). – Абакан: изд-во ФГБОУ ВПО «ХГУ им. Н. Ф. Катанова, 2014. – С.74-75.
  52. **Дутова, С.В.** Влияние экстрактов *Coluria geoides* (*Rosaceae*) на продукцию иммуноглобулинов *in vitro* / С.В. Дутова, М.Р. Карпова, М.А. Мяделец // Мат. II Всеросс. научн. Интернет-конф. с межд. участием (Казань, 3 марта 2015г.). – Казань: ИП Синяев Д.Н., 2015. – С.14-17.
  53. Неделькина, Н.П. Влияние настойки колюрии гравилатовидной на течение экспериментальной септикопиемии / Н.П. Неделькина, С.В. Дутова, В.Ю. Чумаков // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Мат. Седьмой Всеросс. научно-практ. конф. (Новосибирск, 21-22 апреля 2015г.). – Новосибирск: ИП Пермяков С. А., 2015. – С.182-183.
  54. Неделькина, Н.П. Патологические изменения почек на модели экспериментальной септикопиемии в условиях воздействия исследуемого фитопрепарата / Н.П. Неделькина, **С.В. Дутова**, В.Ю. Чумаков // Вопросы современной медицинской науки: Мат. 69 научн. конф. студентов-медиков с межд. участием (Самарканд, 3-4 апреля 2015г.). – Самарканд, 2015. – С.177-178.
  55. Неделькина, Н. П. Морфологическая оценка влияния исследуемого фитопрепарата при изучении острой токсичности / Н.П. Неделькина, **С.В. Дутова**, В.Ю. Чумаков // Проблемы развития АПК Саяно-Алтая: Мат. межд. научно-практ. конф. (Абакан, 12 декабря 2014г.). – Абакан: ООО «Март», 2015. – С.55-57.
  56. Мяделец, М.А. Сравнительная характеристика состава фенольных соединений фракций сухого экстракта *Coluria geoides* (*Rosaceae*) / М.А. Мяделец, **С.В. Дутова** // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник мат. IX межд. симпозиума. – М.: ИФР РАН, 2015. – С.118-123.

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

АОК – антителообразующие клетки  
БАС – биологически активные соединения  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа  
ГСО – государственный стандартный образец  
ГФ – Государственная Фармакопея  
ИС – индекс стимуляции  
ЛС – лекарственное средство  
ЛП – лекарственный препарат  
ЛРС – лекарственное растительное сырье  
МБК – минимальная бактерицидная концентрация  
МПК – минимальная подавляющая концентрация  
МНК – моноклеары  
ФГА – фитогемагглютинин  
ФИ – фагоцитарный индекс  
ФС – фармацевтическая субстанция  
ФЧ – фагоцитарное число  
ЦП – ценопопуляция  
ЦФ – циклофосфан  
ЭБ – эритроциты барана  
ЭМ – эфирное масло  
ЭМР – эфирномасличные растения  
Ig – иммуноглобулины  
Cg – *Coluria geoides* (колюрия гравилатовидная)  
Ns – *Nepeta sibirica* (котовник сибирский)  
Sm – *Schizonepeta multiphida* (схизонепета многонадрезанная)  
Tp – *Thymus petraeus* (тимьян каменный)  
Zc – *Ziziphora clinopodioides* (зизифора клиноподиевидная)

ДУТОВА Светлана Вячеславовна

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММУНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ СЫРЬЯ ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

АВТОРЕФЕРАТ

14.03.06 фармакология, клиническая фармакология