

УДК 615.9:322

# ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОТОКСИЧЕСКИХ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ЛАПЧАТКИ БЕЛОЙ (*POTENTILLA ALBA L.*) ЭКСТРАКТА СУХОГО

В.В. Бортникова<sup>1</sup>, Л.В. Крпкова<sup>1</sup>,  
П.Г. Мизина<sup>1</sup>, Т.А. Гуськова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
лекарственных и ароматических растений»  
(ФГБНУ ВИЛАР), 117216, г. Москва,  
Российская Федерация

<sup>2</sup>Центр трансфера фармацевтических  
технологий имени М.В. Дорогова  
Ярославского государственного  
педагогического университета  
им. К.Д. Ушинского, 150010, г. Ярославль,  
Российская Федерация

**В** результате комплексного изучения аллергенности и иммунотоксичности лапчатки белой экстракта сухого показано, что в тестах общей системной анафилаксии (анафилактический шок) и активной кожной анафилаксии, проведенных на морских свинках альбиносах, а также в реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышьях экстракт не обладает сенсibilизирующим действием. При изучении иммунотоксических свойств установлено, что исследуемый экстракт проявляет стимулирующее действие на первичный гуморальный иммунный ответ в терапевтической дозе 3 мг/кг и не оказывает влияния на эффекторы клеточного звена иммунитета экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** *Potentilla alba L.*, экстракт сухой, аллергенность, иммунотоксичность.

**Введение.** В последние годы лекарственные средства растительного происхождения, в частности, созданные на основе лапчатки белой (*Potentilla alba L.*) семейства розоцветных (*Rosaceae*), входящие в состав БАДов, используют в комплексной терапии гипотиреоза наряду с гормонами щитовидной железы [1]. Позитивный опыт применения экстракта лапчатки белой в качестве БАДа, определил перспективу разработки на его основе нового лекарственного средства терапии гипотиреоза. В качестве лекарственного сырья у этого растения используют корни и корневища. По литературным данным, подземная часть этого растения содержит углеводы (крахмал), иридоиды, сапонины, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды (кверцетин), дубильные вещества (галлотанин), а также элементарный йод и анионы йодистой кислоты, микроэлементы – марганец, медь, цинк, селен [2]. Получение сухого экстракта из высушенных корней и корневищ культивируемого растения лапчатки белой (*Potentilla alba L.*), изучение его химического состава, методов стандартизации, привело к созданию на его основе нового лекар-

ственного средства в виде готовых лекарственных форм – капсул и таблеток для приема внутрь [3].

Одним из обязательных этапов доклинических токсикологических исследований новых фармакологических веществ является оценка их безопасности, в частности, иммунотоксичности и аллергенности.

Целью исследования явилась доклиническая оценка иммунотоксичности и аллергенности лапчатки белой экстракта сухого, впервые полученного во ВНИИ лекарственных и ароматических растений.

**Материалы и методы исследования.** Выбор методов при изучении аллергенности и иммунотоксичности лапчатки белой экстракта сухого определялся требованиями, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств», 2012 г [4] и международной практикой изучения иммунотоксичности.

Эксперименты выполнены на морских свинках альбиносах (самцы, масса тела 350-400 г), мышьях линии *CBA* и *BALB/c* (самцы, масса тела 18-20 г),

**Бортникова Валентина Васильевна** (*Bortnikova Valentina Vasil'evna*), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва, [bortnikova.v@yandex.ru](mailto:bortnikova.v@yandex.ru)

**Крпкова Любовь Вениаминовна** (*Krpkova Lyubov Veniaminovna*), кандидат биологических наук, зав. отделом токсикологии ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва, [krpkova2011@yandex.ru](mailto:krpkova2011@yandex.ru)

**Гуськова Татьяна Анатольевна** (*Guskova Tatyana Anatolievna*), заслуженный деятель науки РФ, чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела доклинических исследований Центра трансфера фармацевтических технологий имени М.В. Дорогова Ярославского государственного педагогического университета имени К.Д. Ушинского, г. Ярославль, [tagus@rambler.ru](mailto:tagus@rambler.ru)

**Мизина Прасковья Георгиевна** (*Mizina Praskovia Georgievna*), доктор фармацевтических наук, профессор, заместитель директора ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва, [mizina-pg@yandex.ru](mailto:mizina-pg@yandex.ru)

полученных из питомника филиал «Андреевка» ФГБУН НЦВМТ ФМБА, Московской области и ФГБНУ ВИЛАР. Содержание, кормление и уход за животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Европейская конвенция, Стасбург, 1986) [5]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела.

В работе использовали лапчатки белой экстракт сухой, полученный в отделе фитохимии ФГБНУ ВИЛАР и представляющий собой аморфный порошок светло-коричневого цвета с розоватым оттенком. Полученный экстракт лапчатки белой стандартизован по сумме фенольных соединений в пересчете на (+)-катехин, содержание которых в образце составило 48% [6].

На основании ранее проведенного изучения фармакологической активности лапчатки белой экстракта сухого рекомендована суточная терапевтическая доза составляла  $\approx 3$  мг/кг. В данном исследовании морским свинкам альбиносам, мышам линии СВА и *BALB/c* исследуемый экстракт вводили в дозах 3 и 30 мг/кг (соответственно суточная и 10-ти кратная суточная терапевтическая) в виде 0,03% и 0,3% водных растворов, приготовленных *ex tempore*. Контрольные животные получали эквивалентные объемы изотонического раствора NaCl.

Потенциальные аллергизирующие свойства лапчатки белой экстракта сухого были оценены с помощью следующих тестов: реакции общей системной, активной кожной анафилаксии и реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Для воспроизведения реакции общей системной анафилаксии (анафилактический шок) животных контрольной ( $n=8$ ) и двух опытных групп ( $n=16$ ) иммунизировали согласно схеме: 1-ая инъекция – подкожно, 2-я и 3-я – внутримышечно, через день в область бедра. На 21-й день после начала сенсibilизации опытным животным внутривенно вводили разрешающую дозу экстракта, равную суммарной сенсibilизирующей, а контрольным – 0,9% раствор NaCl, после чего регистрировали развитие анафилактической реакции. Учет интенсивности проявления анафилактического шока проводили в индексах по Weigle.

В тесте активной кожной анафилаксии, проведенной на морских свинках-альбиносах ( $n=24$ ), сенсibilизированным животным (согласно выше указанной схеме) на 21 день от начала сенсibilизации внутривенно вводили 0,5 мл 1% раствора красителя синего Эванса. Через 20 минут

после этого в предварительно выстриженный участок кожи вводили внутрикожно исследуемый экстракт в двукратном разведении в объеме 50 мкл. Для контроля реакции тому же животному на другой выстриженный участок кожи вводили 50 мкл 0,9% NaCl. Через 30 минут всех животных подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере и на внутренней стороне кожи, в месте введения тест-препарата и 0,9% NaCl (контроль  $n=8$ ), определяли размер синих пятен.

В тесте реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах линии *BALB/c* было создано две экспериментальные группы по 10 животных в каждой: I группа – контроль (ПАФ с раствором Хенкса) в соотношении 1:1; II группа – лапчатки белой экстракт сухой, доза эквивалентная 10 мМ раствору в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) в соотношении 1:1. Оценку реакции ГЗТ проводили через 24 часа после разрешающей инъекции экстракта путем измерения величины отека лапок при взвешивании «контрольной» и «опытной» лапок с последующим расчетом индекса реакции (ИР) по формуле:

$$\text{ИР} = \frac{P_o - P_k}{P_k} \cdot 100$$
, где  $P_o$  – масса опытной лапки,  $P_k$  – масса контрольной лапки.

Влияние изучаемого препарата на гуморальный иммунитет оценивали по тесту генерации антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и титру гемагглютининов в сыворотке крови у мышей, иммунизированных внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (ЭБ) в оптимальной иммуногенной дозе ( $5 \times 10^7$ ) клеток на мышшь. На 5-е сутки после иммунизации животных декапитуировали и в суспензии клеток селезенки определяли число АОК методом локального гемолиза в модификации Cunningham, а в сыворотке крови – титр гемагглютининов в реакции гемагглютинации, поставленной в микротитраторе Такачи. Реакция основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, агглютинировать эритроциты барана, используемые в качестве антигена. Титр антител (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчетливая агглютинация ЭБ) выражали величиной  $\log_2 T$ .

Действие лапчатки белой экстракта сухого на состояние Т-клеточного иммунитета исследовали по тесту индукции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах линии СВА. Для постановки реакции ГЗТ мышей I – V групп ( $n=50$ ) иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе ( $2 \times 10^8$ ) клеток на мышшь. Мышам II и III групп за сутки до иммунизации ЭБ (день «-1») внутрибрюшинно вводили лапчатки белой экстракт сухой в дозах 3 и 30 мг/кг. Мышам IV и V групп исследуемый экстракт в тех же дозах вво-

дили внутрибрюшинно через 24 часа после инъекции антигена (ЭБ, день «+1»). Контрольные мыши (I группа) получали внутрибрюшинно соответствующие количества 0,9% раствора NaCl по схеме (ЭБ, день «+1»). На 5-е сутки после иммунизации все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе ( $7 \times 10^8$ ) клеток на мышшь в объеме 50 мкл (опытная лапа). В подушечку контрольной лапы вводили 50 мкл 0,9% раствора NaCl.

Полученные результаты подвергали статистической обработке методом вариационной статистики с применением «t» – критерия Стьюдента. Достоверность различий с контролем считали при  $P < 0,05$ . Статистические данные обрабатывали с помощью программы Office Excel.

**Результаты и обсуждение.** Иммунизация морских свинок альбиносов экстрактом лапчатки белой в дозах 3 и 30 мг/кг с последующим внутривенным введением разрешающей дозы исследуемого экстракта на 21-й день после начала сенсибилизации не вызывала у животных реакции общей системной анафилаксии. Анафилактический индекс у животных контрольной и опытных групп составил менее единицы (табл. 1).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что введение лапчатки белой экстракта сухого морским свинкам альбиносам в дозах 3 и 30 мг/кг не вызывало реакции общей системной анафилаксии.

В тесте реакции активной кожной анафилаксии, после внутрикожного введения разрешающей инъекции раствора лапчатки белой экстракта сухого, у животных подопытных и контрольной групп, диаметр окрашенного пятна статистически значимо не отличался, реакция гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) была отрицательная (табл. 2).

Интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к химическим соединениям и их длительность зависят от сроков формирования и сочетанного действия различных субпопуляций Т-супрессоров, подавляющих реакцию ГЗТ. Если при индукции реакции ГЗТ мышам вводить химическое вещество в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ), при котором не происходит формирования Т-супрессоров, то появляется возможность выявить даже слабые химические аллергены. В связи с этим в данном исследовании использовали модификацию реакции ГЗТ с применением ПАФ.

Результаты эксперимента показали, что индекс реакции у мышей, сенсибилизированных лапчатки белой экстрактом сухим, не имел статистически достоверных различий по сравнению с соответствующим показателем в контроле (табл. 3).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что лапчатки белой экстракт сухой не потенцировал реакцию ГЗТ у мышей.

Таким образом, при изучении потенциальных

Таблица 1

**Индекс реакции анафилактического шока у морских свинок альбиносов, сенсибилизированных лапчатки белой экстрактом сухим**

Группа животных	Число животных в группе	Индекс реакции по Weigle
I. Контроль, 0,9% NaCl	8	0,5±0,02
II. Лапчатки белой экстракт сухой, доза 3 мг/кг	8	0,6±0,03
III. Лапчатки белой экстракт сухой, доза 30 мг/кг	8	0,5±0,04

Таблица 2

**Выраженность реакции активной кожной анафилаксии у морских свинок, получавших лапчатки белой экстракт сухой**

Группа животных	Размер окрашенного пятна, мм
I. Контроль, 0,9% NaCl	4,2 ±0,4
II. Лапчатки белой экстракт сухой, 3 мг/кг	4,8±0,3
III. Лапчатки белой экстракт сухой, 30 мг/кг	5,0 ±0,5

Таблица 3

**Индекс реакции ГЗТ у мышей, получавших лапчатки белой экстракт сухой**

Группа животных	Индекс ГЗТ, М±m / 24 часа
I. Контроль	0,37 ± 0,05
II. Лапчатки белой экстракт сухой	0,25 ± 0,04

Таблица 4

**Показатели гуморального иммунного ответа мышей линии СВА при 5-дневном внутрижелудочном введении лапчатки белой экстракта сухого**

Группа животных	Показатели иммунного ответа		
	Абсолютное число АОК на одну селезенку	Количество АОК на 10 <sup>6</sup> спленоцитов	Титр гемагглютининов (log <sub>2</sub> T)
I. Контроль, NaCl 0,9%	258000±17000	1952±127	32,0±5,2
II. Лапчатки белой экстракт сухой, 3 мг/кг	360000±22000**	3079±139**	76,8±15,0*
III. Лапчатки белой экстракт сухой, 30 мг/кг	305000±27000	2586±129*	54,2±8,5

Примечание: \* – достоверность различий с контролем (\*P<0,05; \*\*P<0,01)

Таблица 5

**Индекс реакции ГЗТ мышей линии СВА, получавших лапчатки белой экстракт сухой**

Группа животных	Индекс реакции
I. Контроль, 0,9% NaCl, день «+1»	40,5±4,4
II. Лапчатки белой экстракт сухой, 3 мг/кг, день «-1»	59,2±5,6
III. Лапчатки белой экстракт сухой, 30 мг/кг день «-1»	44,5±4,5
IV. Лапчатки белой экстракт сухой, 3 мг/кг день «+1»	53,9±5,5
V. Лапчатки белой экстракт сухой, 30 мг/кг день «+1»	48,5±4,6

аллергизирующих свойств лапчатки белой экстракта сухого в экспериментах на разных видах лабораторных животных не выявлены статистически значимые различия в результатах между контрольными и подопытными группами. Исследуемый экстракт в диапазоне испытанных доз и схем сенсibilизации не вызывал реакции общей анафилаксии (анафилактический шок) и активной кожной анафилаксии, проведенных на морских свинках альбиносах. Лапчатки белой экстракт, введенный с ПАФ, не потенцировал воспалительную реакцию в тесте гиперчувстви-

тельности замедленного типа у мышей линии BALB/c.

При исследовании влияния лапчатки белой экстракта сухого на процессы антителообразования установлено, что исследуемый экстракт повышал показатели гуморального иммунного ответа у мышей. Количество АОК, как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10<sup>6</sup> спленоцитов в группе животных, получавших экстракт в дозе 3 мг/кг, был значительно выше, чем в контроле. Дополнительно для оценки влияния экстракта на В-клеточное звено иммунитета использовали

реакцию выработки гемагглютининов В-лимфоцитами иммунокомпетентных органов мышей при их иммунизации ЭБ. Результаты исследований свидетельствуют, что титр гемагглютининов (log<sub>2</sub>T) возростал, особенно при введении дозы 3 мг/кг. При увеличении дозы экстракта до 30 мг/кг исследуемый показатель у мышей так же увеличивался, но не имел статистически достоверных различий с контролем (табл. 4).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии лапчатка белой экстракта сухого на гуморальный иммунный ответ мышей линии СВА.

При исследовании влияния лапчатки белой экстракта сухого на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемый экстракт не потенцировал индекс реакции ГЗТ у мышей линии СВА при однократном введении в дозах 3 и 30 мг/кг при различных схемах введения (табл. 5).

Лапчатка белой экстракт сухой не влиял на эф-

фекторы клеточного иммунитета мышей.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований показали, что 5-кратное внутрижелудочное введение лапчатки белой экстракта сухого в дозах 3 и 30 мг/кг вызывало значительную стимуляцию первичного иммунного ответа у мышей линии СВА, причем более выраженный эффект наблюдался в терапевтической дозе 3 мг/кг. При различных схемах введения исследуемый экстракт не влиял на клеточный иммунитет.

**Выводы.** 1. Лапчатка белой экстракт сухой не индуцирует аллергические реакции и по своей природе не является потенциальным аллергеном.

2. Лапчатка белой экстракт сухой оказывал стимулирующее действие на первичный иммунный ответ у мышей в дозе 3 мг/кг; в более высокой дозе данный эффект снижался.

3. Изученный экстракт не влиял на клеточный иммунитет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефремов А.П. Лапчатка белая – уникальное природное средство для лечения заболеваний щитовидной железы. <http://www.endonorm.ru/index.php?id=22>
2. Осипов В.И., Поляков Н.А., Сидельников А.Н., Хазиева Ф.М. Проантоцианидины корней и корневищ *Potentilla alba* (Rosaceae). Растительные ресурсы. 2017; 53(1):114-25.
3. Поляков Н.А., Хазиева Ф.М., Мешков А.И., Коротких И.Н., Осипов В.И. Состав и содержание проантоци-

- анидинов в корнях и корневищах лапчатки белой (*Potentilla alba* L.). В кн.: Материалы Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». 14-19 мая 2018 г. Москва; М.:ИФР РАН; 2018;347-
4. Миронов А.Н. ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.:Гриф и К.; 2012;51-79.
5. Европейская конвенция о защите позвоночных жи-

- вотных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г).
6. Бурова А.Е., Мешков А.И., Сайбель О.Л. Разработка методик качественного и количественного определения фенольных соединений в сухом экстракте лапчатки белой (*Potentilla alba* L.). Мат. V науч.-практ. конф. «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», М.; 2017; С.59-2.

## REFERENCES:

1. Efremov A.P. *Potentilla alba* is a unique natural product for the treatment of diseases of the thyroid gland. <http://www.endonorm.ru/index.php?id=22> (in Russian).
2. Osipov V.I., Polakov N.A., Sidel'nikov A.N., Haziyeva F.M. Proanthocyanidins of roots and rhizomes of *Potentilla alba* (Rosaceae). *Rastitel'nye resursy*. 2017; 53(1):114-25 (in Russian).
3. Polakov N.A., Haziyeva F.M., Meškov A.I., Korotkih I.N., Osipov V.I. The composition and content of

- proanthocyanidins in the roots and rhizomes of white *Potentilla alba* (L.). In the book: Materials Of the international Symposium "Phenolic compounds: fundamental and applied aspects". 14 to 19 may 2018 Moscow; M.:IFR RAN; 2018;347-53 (in Russian).
4. Mironov A.N. red. Guidelines for pre-clinical trials of drugs. Part one. M.:Grif i K.; 2012;51-79 (in Russian).
5. European Convention for the protection of vertebrates used for experimental or other scientific purposes

- (Strasbourg, 18 March 1986) (in Russian).
6. Burova A.E., Meškov A.I., Sajbel O.L. Development of methods for qualitative and quantitative determination of phenolic compounds in the dry extract of the white cinquefoil (*Potentilla alba* L.). *Mat. V nauch.- prakt. Conf. "Modern aspects of the use of plant and natural raw materials in medicine"*, M.; 2017; S.59-2 (in Russian).

V.V. Bortnikova<sup>1</sup>, L.V. Krepkova<sup>1</sup>, P.G. Mizina<sup>1</sup>, T.A. Guskova<sup>2</sup>

## INVESTIGATION OF IMMUNOTOXICITY AND ALLERGENIC PROPERTIES OF DRY EXTRACT OF *POTENTILLA ALBA* L.

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 117216, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>M.V. Dorogov Center for Transfer of Pharmaceutical Technologies, K.D. Ushinsky Yaroslavl State Pedagogical University, 150010, Yaroslavl, Russian Federation.

The comprehensive study of allergenicity and immunotoxicity of dry extract of *Potentilla alba* L. has shown that the extract has no sensitizing effect in tests of the general systemic anaphylaxis (anaphylactic shock) and active skin anaphylaxis conducted on *Guinea pigs albinos*, as well as in the reaction of delayed hypersensitivity in mice. In the study of immunotoxic properties, it has been found that the extract has a stimulating effect on the primary humoral immune response at a therapeutic dose of 3 mg / kg and has no influence on the effectors of the cellular immunity of experimental animals.

**Keywords:** *Potentilla alba* L., dry extract, allergenicity, immunotoxicity

Материал поступил в редакцию 18.06.2018 г.