

УДК 615.322:582.794.2:615.277.3:612.017

## ВЛИЯНИЕ ЖЕНЬШЕНЯ НА ГАММА-ИНТЕРФЕРОНОГЕНЕЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

А.В. Кропотов, Н.В. Степаненко, Р.К. Гончарова, О.В. Коршунова, Е.С. Манеева, В.А. Еремеева

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Ключевые слова:** ксенобиотики,  $\gamma$ -интерферон, кислород-зависимый метаболизм, нитроксидпродуцирующая активность.

### INFLUENCE OF PANAX GINSENG ON GAMMA-INTERFERONOGENESIS AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES IN MICE IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNOSUPPRESSION

A.V. Kropotov, N.V. Stepanenko, R.K. Goncharova, O.V. Korshunova, E.S. Maneeva, V.A. Eremeeva  
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

**Background.** Panax ginseng is a Far Eastern medicinal herb that contains substances with biological activity and improves adaptation to different unfavourable conditions. It has been determined that Panax ginseng extract stimulates  $\gamma$ -interferonogenesis in normal conditions and in conditions of its suppression by medicines and chemical agents.

**Methods.**  $\gamma$ -interferonogenesis was tested on a model immunosuppression in mice in normal conditions and in conditions of its suppression by Methotrexate (for intraperitoneal use 0,1 ml/kg a day) or Cadmium chloride (for internal use 3 ml/kg in a day). The dosage of Panax ginseng extract C.A. Mey was 0,1 ml/kg a day for internal use). These substances has been used during 14 days.

**Results.** Xenobiotics trustworthily suppressed the macrophagal functional activity that manifested of depression of oxygen-depended metabolism and macrophagal ability to produce the nitrogen oxide metabolites. The prolonged prophylactic application of Panax ginseng extract removed the Methotrexate-induced and the Cadmium chloride-induced functional defect of macrophages. Panax ginseng extract protects immune cells and stimulates  $\gamma$ -interferonogenesis in mice in normal conditions and in conditions of immunosuppression by xenobiotics.

**Conclusions.** Panax ginseng extract contains a lot of substances with specific pharmacological activity. This plant with properties of adaptogen has large perspective for further study and practical application in different branches of medicine.

**Keywords:** xenobiotics,  $\gamma$ -interferon, oxygen-depended metabolism, produce the nitrogen oxide metabolites.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2, p. 76–79.

Среди цитокинов, обладающих контрольно-регуляторными функциями, особое место отводят интерферонам (ИФН) – индуцибельным полипептидам с широкой противовирусной активностью. Сейчас ни у кого не вызывает сомнения, что ИФН относятся к важнейшим факторам устойчивости организма, так как принимают самое непосредственное участие в различных иммунологических реакциях [3]. К настоящему времени известно около 20 ИФН, наиболее изученными из которых являются, относящиеся к первому или классическому типу ИФН,

синтезируемые различными клетками в ответ на воздействие вирусов или синтетических полирибонуклеотидов (лейкоцитарный ИФН- $\alpha$  и фибробластный ИФН- $\beta$ ). Интерфероны первого типа обладают более сильной противовирусной активностью по сравнению с ИФН- $\gamma$ , относящимся ко второму типу интерферонов, основными продуцентами которых считаются Т-лимфоциты-хелперы 1-го типа. Основные функции ИФН- $\gamma$  – запуск и регулирование антигенспецифического иммунного ответа, а также ингибирование клеток, несущих чужеродные или измененные антигенные детерминанты [9]. Одним из основных свойств ИФН- $\gamma$  считается активация Т-хелперов и макрофагов [3, 12]. Показана способность ИФН этого типа стимулировать фагоцитоз бактерий, обеспечивая антимикробное действие лимфоидных клеток [3, 6]. При этом ИФН- $\gamma$  является активатором эффекторных функций макрофагов: их микробоцидности и цитотоксичности, осуществляемой путем усиления синтеза провоспалительных цитокинов, а также продукции клетками супероксидных и нитроксидных радикалов, активации, в том числе нейтрофилами, кислороднезависимого пути киллинга опухолевых клеток и регуляции других механизмов клеточно-опосредованного иммунного ответа [6, 9].

Наиболее существенной причиной вторичных иммунодефицитов с преобладанием дефектов клеточного иммунного ответа и снижения продукции ИФН- $\gamma$  могут служить, помимо причин эндогенного характера, широкое использование в лечебной практике иммунодепрессантов, антибластомных препаратов и глюкокортикоидов, а также воздействие на организм различных экотоксикантов, в частности, солей тяжелых металлов [4, 8, 13]. Способность ИФН- $\gamma$  усиливать функциональную активность Т-хелперов, макрофагов и нейтрофилов, увеличивать цитотоксичность Т-лимфоцитов, подавлять индукцию иммуноглобулина Е, блокировать репликацию вирусных ДНК и РНК предоставляет возможность успешно использовать данный цитокин (человеческий рекомбинантный  $\gamma$ -интерферон – ингарон) или индукторы его синтеза в организме для лечения инфекций, вызванных внутриклеточными микробами, грибами, простейшими, вирусами, а также в терапии злокачественных опухолей [3].

Манеева Елена Сергеевна – канд. мед. наук, ассистент кафедры общей и клинической фармакологии фармацевтического факультета ТГМУ; e-mail: alena\_nice\_angle@mail.ru

В настоящее время известны сотни химических соединений, в том числе природного происхождения, способных индуцировать синтез различных классов интерферонов, из которых клиническое значение имеют немногие препараты (полудан, циклоферон, амиксин, неовир, ридостин). Сохраняется значительный интерес к фитоадаптогенам, в частности, препаратам женьшеня, характеризующимся широким спектром профилактического действия, в том числе способностью позитивно влиять на некоторые звенья иммунного ответа, и обладающим при этом очень низкой токсичностью [1, 15]. В этой связи, интересно изучить в эксперименте влияние женьшеня на  $\gamma$ -интерфероногенез в условиях его подавления чужеродными соединениями – цитостатиками или солями тяжелых металлов, сопоставив полученные данные с некоторыми показателями, характеризующими функциональную активность макрофагов.

**Материал и методы.** Эксперимент выполнен на беспородных мышах-самцах массой 18–22 г. На первом этапе животные были разделены на 6 групп по 10 особей в каждой:

- 1) интактные (котроль);
- 2) получавшие внутрь 14 дней деалкоголизированную настойку женьшеня в дозе 0,1 или 1 мл/кг в сутки;
- 3) получавшие метотрексат (0,5 мг/кг в сутки) внутривенно;
- 4) получавшие кадмия хлорид в дозе 3 мг/кг внутривенно через день;
- 5) получавшие метотрексат и женьшень 0,1 или 1 мл/кг;
- 6) получавшие кадмия хлорид и женьшень 0,1 или 1 мл/кг.

Выбор доз ксенобиотиков был обусловлен принятыми в экспериментальной фармакологии и токсикологии величинами.

На втором этапе, выполненном по аналогичной схеме, через сутки после последнего введения препаратов, у мышей выделяли суспензию перитонеальных макрофагов и оценивали их функциональное состояние по интенсивности кислородного метаболизма в тесте восстановления нитротетразолиевого синего (НСТ) и суммарной концентрации метаболитов оксида азота. Определение уровня ИНФ- $\gamma$  в плазме крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R.&D. Diagnostics (USA) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Учет результатов выполняли с помощью иммуноферментного анализатора Multiskan (Финляндия) при длине волны 450 нм. Расчеты уровня ИНФ- $\gamma$  осуществляли путем построения калибровочной кривой с использованием специальной компьютерной программы.

Степень активации кислород-зависимого метаболизма макрофагов определяли по величине восстановления НСТ, применяя вариант методики,

предложенной В.П. Мельниковым [7]. Количественные показатели восстановленного НСТ определяли с помощью микролуночного спектрофотометра Micro-Plate ReaderMR 600 (Pynatech, Германия) при длине волны 510 нм. Для расчета НСТ использовали калибровочный график.

Нитроксидпродуцирующую активность макрофагов изучали, используя методику Н.Л. Емченко [2]. Суммарную концентрацию конечных стабильных метаболитов нитрит-аниона  $\text{NO}_2$  и нитрат-аниона  $\text{NO}_3$  определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм на спектрофотометре Micro-Plate ReaderMP 600 (Pynatech, Германия), используя в качестве цветообразующих компонентов сульфаниламид и N-1-нафтилэтилендиамид. Концентрацию нитросоединений рассчитывали по калибровочной кривой.

После 14-го дня мышей выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), и в плазме крови определяли концентрацию ИНФ- $\gamma$ .

Экстрактивные вещества из настойки, приготовленной из корня женьшеня настоящего (Panax ginseng С.А. Меу, Владивостокская фармацевтика), перед опытами подвергали количественному анализу с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC Knaer, (Германия). Идентификацию проводили методом внутренней стандартизации с применением индивидуальных гликозидов, характерных для корней женьшеня, после соответствующей обработки данных на хроматографическом комплексе Compaque Work Station. Содержание индивидуальных гликозидов в исследованном образце составило: Rg1=0,58 мг/мл; Rb1=0,48 мг/мл; Re=0,24 мг/мл; Rg2=0,02 мг/мл; Rf=0,28 мг/мл; Rc=0,20 мг/мл; Rb2=0,05 мг/мл; Rd=0,10 мг/мл; сумма гинзенозидов (панаксозидов) равнялась 1,95 мг/мл.

Полученные результаты выражали в средних арифметических и их средних ошибках и обрабатывали с использованием параметрического критерия Стьюдента.

**Результаты исследования.** У контрольных мышей, не получавших иммуносупрессивного воздействия метотрексатом или кадмия хлоридом, малые дозы женьшеня (0,1 мл/кг в сутки) достоверно – в 3 раза – увеличивали в плазме крови концентрацию ИНФ- $\gamma$  в сравнении с интактными животными, а большие дозы (1,0 мл/кг в сутки) – только на 25 %. Примечательно, что аналогичная картина наблюдалась в наших предыдущих опытах при однократном применении женьшеня, жидкого экстракта элеутерококка или родиолы розовой. Фитоадаптогены только в малых дозах оптимально стимулировали  $\gamma$ -интерфероногенез, который достигал максимума к 72 часу от момента введения препаратов [5].

Метотрексат – препарат с противоопухолевой и иммуносупрессивной активностью – при длительном введении достоверно снижал по сравнению с интактными животными концентрацию ИНФ- $\gamma$  в плазме крови на 34 %, а его сочетанное с женьшенем увеличивало интерферогенез в 2,2 и 1,6 раза, соответственно, в зависимости от дозы адаптогена. Экоотоксикант кадмия хлорид после двухнедельного введения снижал содержание ИНФ- $\gamma$  в крови животных на 50 %, а сочетанное применение его с женьшенем в дозе 0,1 мл/кг в сутки достоверно увеличивало на 86 % этот показатель в сравнении с группой мышей, получавших только кадмий (табл. 1). Таким образом, женьшень в малых дозах оказывал ИНФ- $\gamma$ -стимулирующее действие как на интактных животных, так и на мышей, длительно получавших ксенобиотики.

Одним из наиболее объективных способов оценки функционального состояния макрофагов считается НСТ-тест, в основе которого лежит реакция восстановления тетранитрозолиевого синего. Тест позволяет определять активные формы кислорода, которые генерируются макрофагами и являются важными микробицидными факторами. По данным НСТ-теста, женьшень не увеличивал кислородзависимый метаболизм в перитонеальных макрофагах интактных мышей. Метотрексат и кадмия хлорид после двухнедельного введения экспериментальным животным достоверно уменьшали НСТ-показатель на 31 и 29 %, соответственно. Комбинированное применение ксенобиотиков с женьшенем увеличивало кислородзависимый метаболизм в перитонеальных макрофагах в сравнении с мышами, получавшими метотрексат в 2,6, а кадмия хлорид – в 3,9 раза (табл. 2).

При анализе нитроксидпродуцирующей активности макрофагов оказалось, что женьшень у интактных животных не влиял на «покоящиеся» фагоцитарные клетки. Ксенобиотики – метотрексат или кадмия

Таблица 1

*Влияние женьшеня на концентрацию ИНФ- $\gamma$  в плазме крови мышей при иммуносупрессии, вызванной метотрексатом или кадмия хлоридом*

Группа животных	ИНФ- $\gamma$ , пг/мл
Контроль	73,60 $\pm$ 3,56
Женьшень (0,1 мл/кг)	215,50 $\pm$ 13,43 <sup>1</sup>
Женьшень (1 мл/кг)	101,00 $\pm$ 8,36
Метотрексат	48,80 $\pm$ 2,15 <sup>1</sup>
Метотрексат + женьшень (0,1 мл/кг)	110,00 $\pm$ 5,21 <sup>2</sup>
Метотрексат + женьшень (1 мл/кг)	76,00 $\pm$ 4,11 <sup>2</sup>
Кадмия хлорид	36,60 $\pm$ 4,12 <sup>1</sup>
Кадмия хлорид + женьшень (0,1 мл/кг)	68,40 $\pm$ 4,30 <sup>2</sup>
Кадмия хлорид + женьшень (1 мл/кг)	43,80 $\pm$ 3,18

<sup>1</sup> Различие статистически значимо по сравнению с контролем.

<sup>2</sup> Различие статистически значимо по сравнению с соответствующим ксенобиотиком.

Таблица 2

*Влияние метотрексата, кадмия хлорида и их комбинаций с женьшенем на интенсивность кислородзависимого метаболизма в перитонеальных макрофагах у мышей*

Группа животных	НСТ, % к контролю
Контроль	100,0 $\pm$ 7,4
Женьшень (0,1 мл/кг)	109,0 $\pm$ 5,6
Метотрексат	69,0 $\pm$ 4,8 <sup>1</sup>
Метотрексат + женьшень	183,0 $\pm$ 10,3 <sup>2</sup>
Кадмия хлорид	71,0 $\pm$ 6,3 <sup>1</sup>
Кадмия хлорид + женьшень	280,0 $\pm$ 13,6 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Различие статистически значимо по сравнению с контролем.

<sup>2</sup> Различие статистически значимо по сравнению с соответствующим ксенобиотиком.

Таблица 3

*Влияние метотрексата, кадмия хлорида и их сочетаний с женьшенем на нитроксидпродуцирующую способность перитонеальных макрофагов у мышей*

Группа животных	Метаболиты NO, нмоль/мл
Контроль	40,60 $\pm$ 3,52
Женьшень (0,1 мл/кг)	50,00 $\pm$ 4,90
Метотрексат	18,80 $\pm$ 4,08 <sup>1</sup>
Метотрексат + женьшень	117,20 $\pm$ 9,54 <sup>2</sup>
Кадмия хлорид	25,90 $\pm$ 7,56 <sup>1</sup>
Кадмия хлорид + женьшень	98,60 $\pm$ 9,68 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Различие статистически значимо по сравнению с контролем.

<sup>2</sup> Различие статистически значимо по сравнению с соответствующим ксенобиотиком.

хлорид – достоверно повышали эту активность в 2,2 и 1,6 раза, соответственно. Комбинация женьшеня с ксенобиотиками восстанавливала функциональную активность фагоцитов, причем в сравнении с группой мышей, получавших только метотрексат, – в 6,2 раза, а кадмий – в 3,8 раза. При этом данные показатели были достоверно выше концентрации метаболитов оксида азота в сравнении, как с интактными животными, так и с группой мышей, которым вводили только женьшень (табл. 3).

В результате проведенных экспериментов установлено, что малые дозы женьшеня (0,1 мл/кг в сутки) после двухнедельного введения стимулируют  $\gamma$ -интерферогенез, как у интактных мышей, так и у животных, где наблюдалось его ингибирование ксенобиотиками. При этом женьшень восстанавливал функциональную активность перитонеальных макрофагов, иницируя в них интенсивность кислородзависимого метаболизма и нитроксидпродуцирующую способность, сниженную метотрексатом или кадмием.

**Обсуждение полученных данных.** В результате эксперимента установлено, что спектр адаптивных реакций при профилактическом применении женьшеня не ограничивается хорошо известным тонизирующим

и антистрессорным действием препарата, а может быть связан с его индуктивным влиянием на  $\gamma$ -интерфероногенез и функциональную активность макрофагов.

В монографиях И.И. Брехмана (1957) и И.В. Дардымова (1976), а также многочисленных поздних публикациях подробно изложена фармакодинамика женьшеня, показана его способность повышать неспецифическую резистентность организма к неблагоприятным факторам внешней и внутренней среды, которая объяснялась авторами с позиций нейрофармакологии и биохимии стресса, усилением биосинтеза белка и активацией нуклеинового обмена.

Основными действующими веществами корня женьшеня принято считать гликозиды, так как установлено, что их сумма и индивидуальные панаксозиды обладают сходной фармакодинамикой с этанольными экстрактами. Вместе с тем, некоторые эффекты женьшеня, такие как повышение сопротивляемости к генерализованным бактериальным и вирусным инфекциям, противовоспалительное действие, коррекция нарушенной бактерицидной функции нейтрофилов и макрофагов, уменьшение метастазирования при злокачественных опухолях и некоторые другие феномены могут быть объяснены исключительно с иммунологических позиций. В ряде работ было показано ИФН-индуцирующее действие полисахаридов, полученных из корня и культуры клеток женьшеня [10, 14], а также стимулирующее влияние экстрактов на макрофаги и механизмы иммуногенеза [15].

В наших предыдущих исследованиях продемонстрировано, что однократное введение женьшеня вызывало индукцию  $\gamma$ -интерфероногенеза у здоровых мышей и восстанавливало уровень цитокина, сниженный разовым введением солей тяжелых металлов или противоопухолевых препаратов [5, 11]. Хроническая интоксикация метотрексатом или кадмия хлоридом оказывала сходное действие в виде ингибирования  $\gamma$ -интерфероногенеза и снижения функциональной активности перитонеальных макрофагов. Женьшень, стимулирующий  $\gamma$ -интерфероногенез в условиях хронического эксперимента, не изменял кислородзависимый метаболизм и нитроксидпродуцирующую способность макрофагов у интактных животных. Однако в условиях снижения функциональной активности фагоцитов вследствие воздействия ксенобиотиков под влиянием женьшеня она достоверно увеличивалась.

Таким образом, женьшень оказывает защитное действие в отношении иммунокомпетентных клеток не только косвенно, стимулируя синтез ИФН- $\gamma$ , но и за счет, по-видимому, прямого влияния на фагоциты. Полученные результаты подтверждают данные литературы, согласно которым адаптогены оказывают нормализующее действие в условиях угнетения физиологических функций.

#### Литература

1. Барнаулов О.Д. Женьшень и другие адаптогены: лекции по фитотерапии. СПб.: Элби, 2001. 140 с.

2. Емченко Н.Л., Цыганенко О.И., Ковалевская Т.В. Универсальный метод определения нитратов в биосферах организма // Клиническая лабораторная диагностика. 1994. № 6. С. 19–20.
3. Ершов Ф.И., Киселева О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 368 с.
4. Забродский П.Ф., Мандич В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков. Саратов: СВИБХЗ, 2007. 420 с.
5. Кропотов А.В., Степаненко Н.В. Способность растительных адаптогенов индуцировать гамма-интерфероногенез в условиях экспериментальной иммуносупрессии // International Journal on Immunorehabilitation. 2001. Т. 6, № 1. С. 75–76.
6. Лукина Е.А. Система мононуклеарных фагоцитов и биологические эффекты провоспалительных цитокинов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. Т. 8, № 5. С. 7–13.
7. Мельников П.В. Тест восстановления нитросинего тетразолия мононуклеарными фагоцитами // Лабораторное дело. 1991. № 8. С. 51–53.
8. Певницкий Л.А., Баймуханова Г.К., Писарев В.М. Экологический иммунодефицит: иммунологические аспекты его развития и коррекции // Вестник АМН. 1994. № 4. С. 20–27.
9. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237–243.
10. Смолина Т.П., Орлова Т.Г., Щегловитова О.Н., Беседнова Н.Н. Интерферониндуцирующее действие полисахарид содержащих биополимеров из корня и культуры клеток женьшеня // Антибиотики и химиотерапия. 1998. № 11. С. 21–23.
11. Степаненко Н.В., Кропотов А.В. Некоторые иммунокорректирующие свойства растительных адаптогенов // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2004. № 6–7. С. 42–45.
12. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. 2001. № 4. С. 4–18.
13. Савченко И.А., Корнеева И.Н., Погодин И.С. [и др.] Оценка специфической фармакологической активности гуминовых веществ сапропеля Омской области // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 4. С. 51–55.
14. Decostes J. Immunotoxicology drugs and chemicals. Amsterdam – New York – Oxford: Elsevier. 2004. 398 p.
15. Shin I.Y., Song I.Y., Yun Y.S. [et al.] Immunostimulatory effects of acidic polycarides extract of Panax ginseng on macrophage function // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2002. No. 24. P. 469–482.

Поступила в редакцию 28.04.2015.

#### Влияние женьшеня на гамма-интерфероногенез и функциональную активность перитонеальных макрофагов у мышей в условиях экспериментальной иммуносупрессии

А.В. Кропотов, Н.В. Степаненко, Р.К. Гончарова, О.В. Коршунова, Е.С. Манеева, В.А. Еремеева  
Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Резюме.** В эксперименте на беспородных мышках-самцах было установлено, что экстракт женьшеня стимулирует  $\gamma$ -интерфероногенез как у интактных животных, так и при иммуносупрессии, индуцированной ксенобиотиками (метатрексат, кадмия хлорид). Ксенобиотики угнетали функциональную активность макрофагов, что проявлялось депрессией их кислородзависимого метаболизма и снижением способности вырабатывать оксид азота. 14-дневное применение экстракта женьшеня устраняло функциональный дефект макрофагов. Таким образом, женьшень, содержащий биологически активные вещества, стимулирующие  $\gamma$ -интерфероногенез, является перспективным лекарственным растением для дальнейшего изучения и внедрения в медицинскую практику.

**Ключевые слова:** ксенобиотики,  $\gamma$ -интерферон, кислородзависимый метаболизм, нитроксидпродуцирующая активность.