

Оригинальное исследование
УДК 615.322: 615.038: 616-097

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ДУДНИКА АМУРСКОГО (ANGELICA AMURENSIS) НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ IN VITRO

И. А. Волчек^{1,2} А. С. Теряев²

¹ Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Россия, Москва

² Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии, Россия, Москва

АННОТАЦИЯ

Введение. Дисбаланс соотношения цитокинов лежит в основе патогенеза многих заболеваний и патологических процессов. Современные фармакологические средства, полученные химическим синтезом или биотехнологическим путем, в ряде случаев уступают веществам природного происхождения. Главными преимуществами последних перед синтетическими аналогами являются их относительно малая токсичность по отношению к организму, схожесть химической структуры природных соединений и физиологически активных веществ человека, что в значительной степени ускоряет включение препаратов в биохимические процессы. Поэтому внимание исследователей вновь привлекли средства традиционной медицины, в частности, препараты растений рода *Angelica* семейства *Ariaceae* (зонтичные).

Цель работы. Провести сравнительное исследование цитокинмодулирующего эффекта экстрактов Дудника амурского (*Angelica amurensis*), полученных разными методическими приемами.

Материалы и методы. В качестве исходного сырья использовали корни и траву Дудника амурского (*Angelica amurensis*). Для экстрагирования материала использовали методы: водно-спиртовой экстракции в циркуляционном экстракторе «Сокслет»; погружной ультразвуковой экстракции в водно-спиртовом растворе; ускоренной экстракции этанолом ASE (Accelerated solvent extraction).

Для определения цитокинмодулирующего эффекта экстрактов *Angelica amurensis*, полученных разными методическими приемами, исследовали синтез GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров.

Результаты. Установлено, что препараты *Angelica amurensis* обладают несомненным выраженным эффектом в отношении синтеза цитокинов мононуклеарными клетками человека. При этом направление действия существенно зависит от способа экстракции, который определяет состав и соотношение ингибирующих и/или стимулирующих компонентов.

Выводы. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности и целесообразности разработки методов создания новых фармацевтических субстанций и композиций на основе экстрактов растений рода *Angelica*, применимых в медицине, ветеринарии, в качестве биологически активных добавок и в косметологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокины, растительные экстракты, *angelica amurensis*

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ: Волчек Игорь Анатольевич, e-mail: igor.volchek@gmail.com

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Волчек И. А., Теряев А. С. Влияние экстрактов дудника амурского (*Angelica amurensis*) на синтез цитокинов in vitro. Вестник медицинского института непрерывного образования. — 2023. — Т. 3, № 2. — С. 8–13. — DOI 10.36107/2782-1714_2023-3-2-8-13

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ: Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии, целевое финансирование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы не имеют конфликта интересов, имеющих отношение к содержанию этой статьи.

INFLUENCE OF ANGELICA AMURENSIS EXTRACTS ON THE CYTOKINE SYNTHESIS IN VITRO

I. A. Volchek^{1,2}, A. S. Teryaev²¹ Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia² Research Center for Immunology and Allergology, Moscow, Russia

ABSTRACT

Background. An imbalance in the ratio of cytokines underlies the pathogenesis of many diseases and pathological processes. Modern pharmacological agents, obtained by chemical synthesis or biotechnologically, in some cases are inferior to substances of natural origin. The main advantages of the latter over synthetic analogues are their relatively low toxicity to the body, the similarity of the chemical structure of natural compounds and physiologically active human substances, which greatly accelerates the inclusion of drugs in biochemical processes. Therefore, the attention of researchers was again attracted by traditional medicine, in particular, preparations of plants of the genus *Angelica* of the family *Apiaceae* (*Umbelliferae*).

Aim. To conduct a comparative study of the cytokine-modulating effect of *Angelica amurensis* extracts obtained by different methods.

Materials and Methods. Roots and grass of *Angelica amur* (*Angelica amurensis*) were used as feedstock. The following methods were used to extract the material: water-alcohol extraction in a circulating Soxhlet extractor; submersible ultrasonic extraction in a water-alcohol solution; accelerated extraction with ethanol ASE (Accelerated solvent extraction).

To determine the cytokine-modulating effect of *Angelica amurensis* extracts obtained by various methods, we studied the synthesis of GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α by peripheral blood mononuclear cells of healthy donors.

Results. It has been established that preparations of *Angelica amurensis* have a pronounced effect on the synthesis of cytokines by human mononuclear cells. In this case, the direction of action significantly depends on the extraction method, which determines the composition and ratio of inhibitory and/or stimulating components.

Conclusions. The research results indicate the prospects and expediency of developing methods for creating new pharmaceutical substances and compositions based on extracts of plants of the genus *Angelica*, applicable in medicine, veterinary medicine as biologically active additives and, in cosmetology.

KEYWORDS: cytokines, plant extracts, *angelica amurensis*

CORRESPONDENCE: Volchek Igor Anatolyevich, e-mail: igor.volchek@gmail.com

FOR CITATIONS:

Volchek I. A., Teryaev A. S. Influence of Amur angelica (*Angelica amurensis*) extracts on cytokine synthesis in vitro. Bulletin of the Medical Institute of Continuing Education. — 2023. — V. 3, № 2. — P. 8–13. — DOI 10.36107/2782-1714_2023-3-2-8-13

FUNDING SOURCE: Research Center for Immunology and Allergology, targeted funding.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST: The authors have no conflict of interest, relevant to the content of this article.

ВВЕДЕНИЕ

Спектр развития современной фармацевтики вновь дополнился исследованиями средств традиционной медицины, в основном, китайской и аюрведической (индийской). В этом направлении большой научный и практический интерес представляет изучение веществ растений рода Дудник (*Angelica*), семейства Зонтичные (*Ariaceae*), в частности, Дудника амурского (*Angelica amurensis*).

Важнейшей задачей, а также весьма удобной и информативной моделью исследования потенциальных фармацевтических субстанций является оценка показателей синтеза цитокинов.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось определение цитокинмодулирующего эффекта экстрактов Дудника амурского (*Angelica amurensis*), полученных разными методическими приемами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В качестве исходного сырья использовали корни и траву Дудника амурского (*Angelica amurensis*) (далее в тексте АА), заготовленные в Приамурье в конце августа-сентябре, высушенные в тени при температуре не выше 23 °С и измельченные до размера частиц 0,1-0,5 мм.

Экстрагирование материала

Для получения экстракта использовали 3 различных метода:

1. Метод водно-спиртовой (40%) экстракции в циркуляционном экстракторе «Сокслет» при 37 °С в течение 72 часов (далее образец S1).

2. Метод погружной ультразвуковой экстракции в водно-спиртовом растворе при концентрации этанола 55 %, амплитуде ультразвука 38 % и времени экстракции 26 мин. (далее образец S2).

3. Метод ускоренной экстракции ASE (Accelerated solvent extraction) с использованием 40% этанола при 100-130°C в течение 10 мин. (далее образец S3).

Лабораторные методы

Для оценки влияния экстрактов АА на спонтанную и митоген-индуцированную продукцию цитокинов использовали мононуклеарные клетки здоровых доноров. Свежую гепаринизированную кровь (20 МЕ/мл) 10 доноров забирали в вакуумные пробирки. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) осуществляли градиентным центрифугированием в градиенте фиколл-пак [1]. Выделенные МНК вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 1×10^6 на лунку в объеме 200 мкл среды RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 2мМ/мл HEPES. В контрольные образцы добавляли по 0,15 мл среды RPMI 1640 (Control — культура интактных клеток) или фитогемагглютинин (PHA) в конечной концентрации 10 мкг/мл (PHA — культура стимулированных митогеном клеток). Лиофилизированные экстракты АА, полученные разными методами (S1, S2, S3), разводили средой RPMI 1640 1:100, и, применительно к препарату S1 — еще 1:1000 и 1:10000. Затем по 0,15 мл вносили в соответствующие лунки. Клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37 °С 36 часов. По окончании инкубации надосадочную жидкость переносили в другие планшеты и замораживали при -20 °С до использования. В полученных пробах определяли количество гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF), интерферона гамма (IFN γ), интерлейкинов 2, 4, 6, 8, 10 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10), фактора некроза опухолей альфа (TNF α).

Анализ проведен методом цитометрических бус Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Grp I Panel 8-plex (Bio-RAD) по протоколу производителя. Алгоритм анализа приведен на рис. 1 а-с.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-7».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования эффектов представлены в таблице 1 и на рисунках 1, 2, 3.

Таблица 1. Влияние экстрактов Дудника Амурского на продукцию цитокинов МНК (разведение 1:100, пг/мл)

	GM-CSF	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF α
Control	10,2 ± 0,3	0	15,2 ± 0,1	3,4 ± 0,4	145,3 ± 0,9	91,4 ± 1,2	0	0
PHA	35,2 ± 0,5*	0	22,2 ± 1,2*	3,08 ± 0,09	227,9 ± 10,2*	69,4 ± 7,8	44,3 ± 1,2*	115,8 ± 1,3*
S1	347,1 ± 0,3*#	1606,1 ± 15,3*#	50,3 ± 2,2*#	35,4 ± 3,1*#	543,8 ± 10,2*#	362,3 ± 2,5*#	175,4 ± 3,2*#	1538,4 ± 10,5*#
S2	14,3 ± 0,7#	0	2,09 ± 0,7*#	12,4 ± 0,4*#	126,5 ± 0,6#	159,4 ± 0,8*#	0#	0#
S3	169,3 ± 0,6*#	1091,2 ± 18*#	45,8 ± 0,2*#	38,5 ± 0,6*#	453,7 ± 0,7*#	435,7 ± 0,3*#	144,2 ± 0,2*#	1538,7 ± 21,3*#

Примечание.

* - статистически достоверно (P ≤ 0,05) по сравнению с необработанными клетками (Control)

- статистически достоверно (P ≤ 0,05) по сравнению с клетками, обработанными PHA

Таблица 2. Влияние экстракта Дудника Амурского S1 на продукцию цитокинов МНК (разведения 1:100; 1:1000; 1:10000; пг/мл)

	Dilution	GM-CSF	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF α
Control		10,2 ± 0,3	0	15,2 ± 0,1	3,4 ± 0,4	145,3 ± 0,9	91,4 ± 1,2	0	0
PHA		35,2 ± 0,5*	0	22,2 ± 1,2*	3,08 ± 0,09	227,9 ± 10,2*	69,4 ± 7,8	44,3 ± 1,2*	115,8 ± 1,3*
S1	100	347,3 ± 1,4*#	1606,5 ± 2,7*#	50,2 ± 1,3*#	35,4 ± 2,7*#	543,6 ± 2,8*#	362,5 ± 2,8*#	175,5 ± 3,7*#	1538 ± 23*#
S1	1000	182,8 ± 2,6*#	1333,9 ± 9,6*#	50,5 ± 2,2*#	18,3 ± 2,2*#	655,9 ± 8,6*#	399,7 ± 8,4*#	313,9 ± 4,6*#	1923 ± 43*#
S1	10000	169,8 ± 4,3*#	788,6 ± 7,7*#	37,6 ± 2,6*#	50,8 ± 6,5*#	685,5 ± 7,7*#	701,8 ± 5,7*#	288,1 ± 12*#	1269 ± 28*#

Примечание.

* - статистически достоверно (P ≤ 0,05) по сравнению с необработанными клетками (Control)

- статистически достоверно (P ≤ 0,05) по сравнению с клетками, обработанными PHA

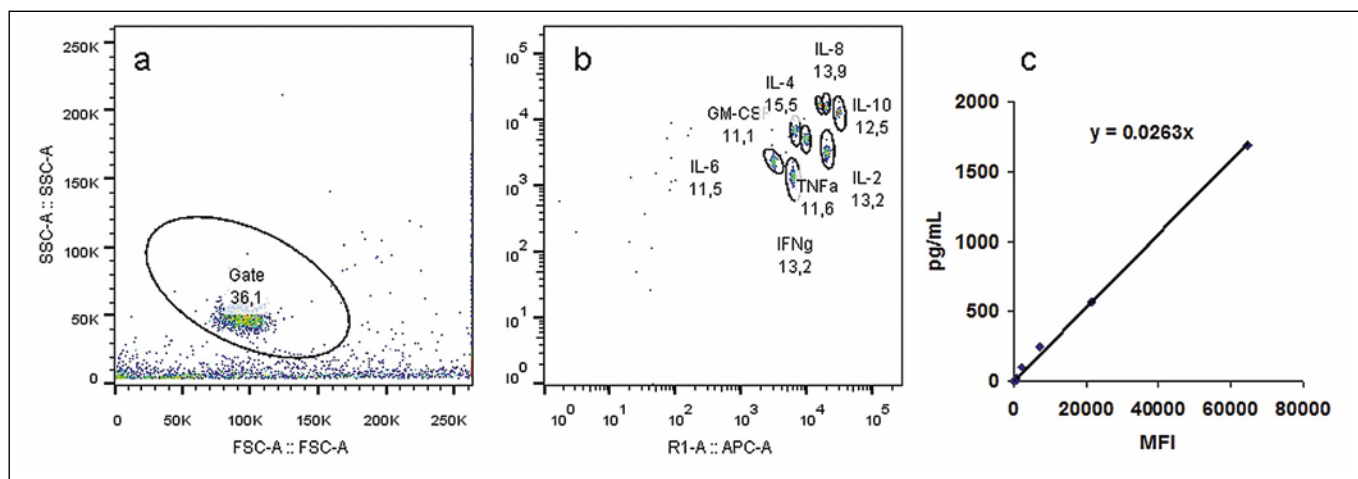


Рис. 1. Магнитные бусы с иммобилизованными антителами к цитокинам (а) включают 8 групп с антителами к ИЛ-2, 4, 6, 8, 10, интерферону гамма, фактору некроза опухоли альфа, гранулоцитарно-макрофагальному фактору роста (б). Примерная титровочная кривая для определения концентрации цитокинов (с)

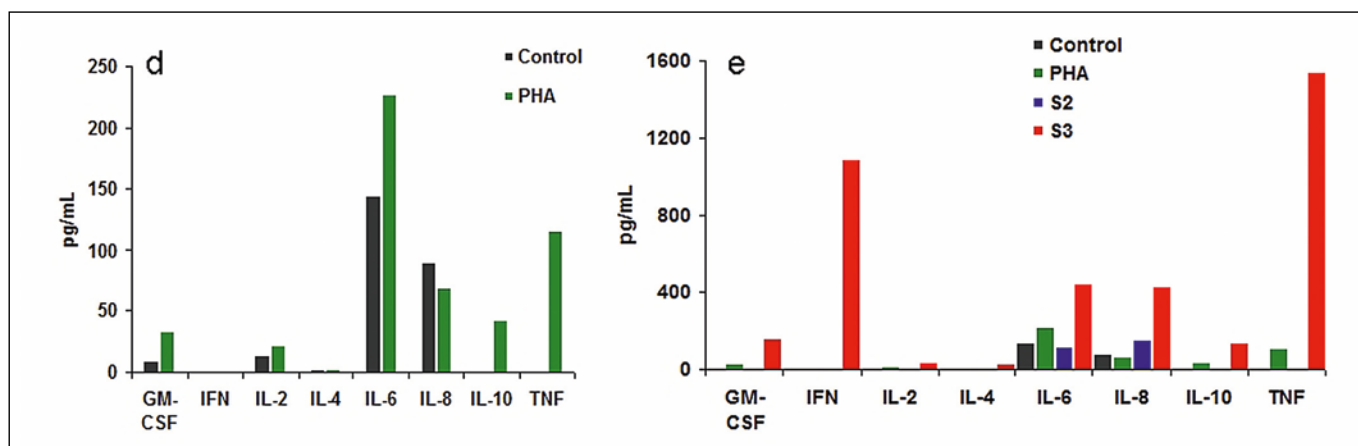


Рис. 2. Продукция цитокинов в ответ на PHA (d) и препараты S2 и S3 (e)

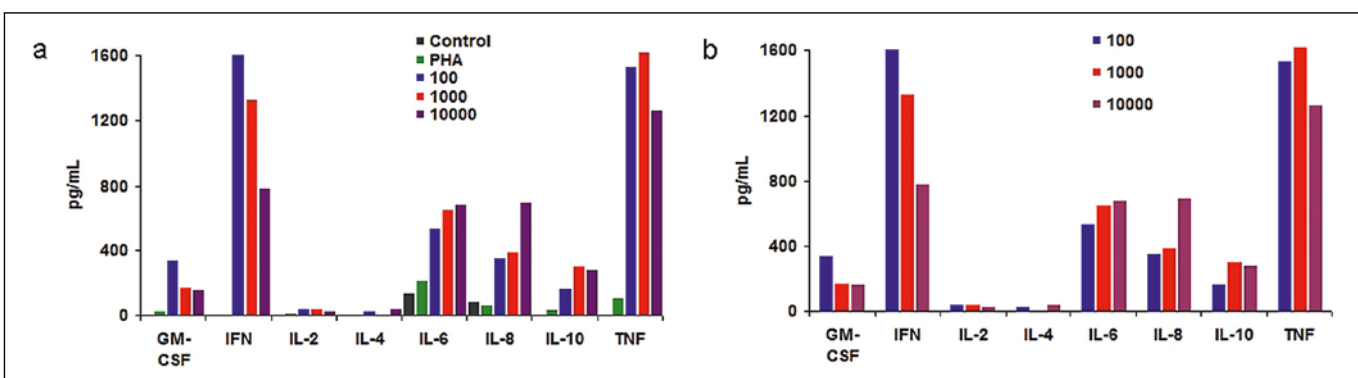


Рис. 3. Продукция цитокинов в ответ на препарат S1 в различных разведениях вместе с контролями (а) и без контролей (б)

Как видно из таблицы 1, добавление PHA достоверно стимулировало выработку мононуклеарами GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-10, TNFα.

Действие экстрактов АА во многом различалось.

Так, уровень GM-CSF в ответе на S1 и S3 достоверно повышался как по отношению к контролю, так и в сравнении с таковым на фоне предобработки PHA. Концентрация этого цитокина под влиянием S2, напротив, не изменялась по отношению к контролю и была достоверно снижена в сравнении с PHA.

Различия установлены и по отношению к другим изучавшимся цитокинам.

Под влиянием S1 и, в меньшей степени, S3, достоверно увеличивалась продукция IFNγ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα.

Под влиянием S2 увеличивалась выработка IL-4 и IL-8, но снижалась, по отношению к пробам с PHA, IL-2, IL-6, IL-10, TNFα. Примечательно, что уровень IL-2 достоверно снижался и по отношению к контролю, т.е. интактным клеткам.

Таким образом, препарат S1 в разведении 1:100 обладал стимулирующим действием в отношении всех изучаемых цитокинов, уровень которых достоверно превышал таковой как при использовании РНА, так и других экстрактов. Препарат S3 показал такое же направление действия, однако выраженность его была несколько ниже. Обращает на себя внимание тот факт, что стимулирующее действие данных экстрактов было выражено как в отношении про-, так и противовоспалительных цитокинов.

На этом фоне препарат S2 показал резко отличный эффект. Так, если под влиянием РНА, S1, S3 наблюдалась стимуляция выработки GM-CSF, то S2, наоборот, снижал этот уровень даже в сравнении с РНА. Аналогичная картина наблюдалась в отношении IL-2, IL-6, IL-10, TNF α . Что касается IL-4 и IL-8, то экстракт S2 стимулировал выработку этих цитокинов достоверно сильнее, чем РНА, однако слабее, чем экстракты S1 и S3 (табл. 1).

Поскольку наибольшей стимулирующей активностью обладал препарат S1, это побудило нас провести его более детальное исследование в других разведениях, а именно, 1:1000 и 1:10 000.

Результаты исследования представлены в таблице 2 и на рисунке 3.

Как видно из таблицы 2, эффект препарата был стимулирующим во всех разведениях, однако в отношении разных цитокинов результаты разнились. Если уровень GM-CSF, IFN γ и IL-2 при увеличении разведения постепенно снижался, то концентрация других цитокинов изменялась не столь однозначно. В разведении 1:1000 уровень IL-6, IL-8, IL-10 и, особенно, TNF α был выше, чем в разведении 1:100, а в разведении 1:10 000 препарат проявлял большую активность в отношении выработки IL-4, IL-6 и, особенно, IL-8.

Таким образом, препарат S1 обладал активностью в широком диапазоне доз. При разведении в 10000 не достигнуто полное снижение активности, хотя тенденция к снижению есть (по основным цитокинам IFN γ и TNF α). При этом отмечен интересный факт инверсии активности в отношении IL-4 (снижение уровня в разведении 1:1000, но повышение в разведении 1:10000); в отношении IL-8 (резкое повышение уровня в разведении 1:10000); IL-10 (повышение концентрации в разведениях 1:1000 и 1:10000) и TNF α (резкое увеличение синтеза в разведении 1:1000).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, экстракты Дудника амурского (*Angelica amurensis*), полученные различными методами, обладали различной активностью в отношении синтеза цитокинов МНК здоровых доноров. Очевидно, это обусловлено спектром выделяемых тем или иным методом биологически активных веществ.

Спектр веществ, выделенных из растений рода Дудник (*Angelica*), весьма широк (кумарины, эфирные масла, алкалоиды, фенолы, стериды, бензофураны, по-

лиацетилены и полисахариды). На сегодняшний день обнаружено более 300 химических компонентов (изоимператорин, императорин, оксипейседанин, гидрат оксипейседанина, бергаптен, биакангелицин, феллоптерин, биакангеликол, изопимпинеллин, ксантотоксол, ксантотоксин, пимпинеллин, скополетин, β -ситостерол, даукостерол и др.). [2, 3, 4].

Современные фармакологические исследования родственного растения *Angelica dahurica* показали что его компоненты проявляли противовоспалительную, противоопухолевую, антиокислительную, обезболивающую, нейропротекторную, гепатопротекторную активность, противовирусные и антимикробные эффекты, воздействие на кожные заболевания. [5].

В отношении влияния на синтез цитокинов данные неоднозначны.

Так, показано, что разные фракции этанольного экстракта Дудника даурского обладали различным влиянием на синтез провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-4 в культуре клеток RBL.2H3. Фракции, содержащие фуранокумарины, ингибировали синтез TNF α , IL-1 β и IL-4 и высвобождение гистамина путем уменьшения активации NF- κ B [3].

В другом исследовании остол, колумбианадин и колумбианетина ацетат, выделенные из корней *Angelica pubescens*, обнаружили способность ингибировать продукцию и выделение фактора хемотаксиса моноцитов 1 типа (про-воспалительный фактор) [6].

Результаты исследования экспрессии цитокинов в тканях больных пролежнями показали, что уровни IL-8, EGF, TGF- β и VEGF были достоверно повышены под влиянием лечения с применением Дудника даурского по сравнению с контролем, что коррелировало со значительным клиническим эффектом [7].

Таким образом, действие экстрактов растений рода *Angelica* на синтез цитокинов может быть как ингибирующим, так и стимулирующим, что и подтверждается приведенными выше результатами. Несомненно, что эффект зависит от состава экстракта (преобладание стимулирующих или ингибирующих фракций) и определяется способом экстракции.

Следует также учитывать данные, касающиеся свойств самих цитокинов, а также межцитокинового взаимодействия. Так, например, известно, что в зависимости от концентрации, IL-2 может оказывать как стимулирующее, так и супрессивное действие. [8]. В зависимости от инициирующего сигнала возможна продукция разных изомеров интерлейкина 4 и, соответственно, его разнонаправленный эффект [9].

Вариации и инверсии ответа различных цитокинов на высокие разведения препарата S1 очевидно можно связать с известным эффектом сверхмалых доз. В литературе описано усиление эффекта или инверсии действия сверхмалыми дозами биологически активных веществ [10]. Следует, однако, указать, что данное явление находится лишь в начальной фазе изучения теоретической биологии и биофизики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракты Дудника амурского (*Angelica amurensis*) обладают несомненным выраженным эффектом в отношении синтеза цитокинов мононуклеарными клетками человека. При этом направление действия существенно зависит от способа экстракции, который определяет состав и соотношение ингибирую-

щих и/или стимулирующих компонентов. Полученные данные указывают на перспективность и целесообразность продолжения исследований для создания новых фармацевтических субстанций и композиций, применимых в медицине, ветеринарии, а также в качестве биологически активных добавок и в косметологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Практикум по иммунологии: учебн. пособие / под ред. И. А. Кондратьевой, В. Д. Самуилова // М. — Изд-во МГУ. — 2001. — 224 с.
2. Hata K., Kozawa M., Yen K. Y., Kimura Y. [Pharmacognostical studies on umbelliferous plants. XX. Studies on Chinese drug "baku-shi". 5. On the coumarins of the roots of *Angelica formosana* Boiss. and *A. anomala* Lall]. *Yakugaku Zasshi*. — 1963. — Jun. — 611-4.
3. Li D., Wu L. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* cause anti-allergic inflammation. *Exp Ther Med*. — 2017. — Jul;14(1):874-880.
4. Liang B., Xu L., Zou Z. and Yang S.: Chemical constituents isolated from *Angelica dahurica* var. *formosana*. *Chin Trad Herb Drugs* 36: 1132,1137, 2005.
5. Zhao H., Feng Y. L., Wang M., Wang J. J., Liu T., Yu J. / The: A Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Front Pharmacol*. — 2022. — Jul 1;13:896637.
6. Yang Y. Separation and Enrichment of Three Coumarins from *Angelicae Pubescentis Radix* by Macroporous Resin with Preparative HPLC and Evaluation of Their Anti-Inflammatory Activity / Y. Yang, R. Zhu, J. Li, X. Yang, J. He, H. Wang, Y. Chang // *Molecules*. — 2019. — V. 24. — P. 2664.
7. Gong F., Niu J., Pei X. Clinical effects of *Angelica dahurica* dressing on patients with I-II phase pressure sores // *Pharmazie*. — 2016. — Nov 2. — 71(11):665-669.
8. Pol J. G., Caudana P., Paillet J., Piaggio E., Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression // *J Exp Med*. — 2020. — Jan 6. — 217(1):e20191247.
9. Luzina I. G., Keegan A. D., Heller N. M., Rook G. A., Shea-Donohue T., Atamas S. P. Regulation of inflammation by interleukin-4 // a review of "alternatives". *J Leukoc Biol*. — 2012. — 92(4):753-764.
10. Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Мальцева Е. Л. / Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // *Ж.: Химическая физика*. — 2003. — Т. 22. — № 2. — С. 21-40.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Волчек Игорь Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». 125080 Москва, Волоколамское шоссе, д. 11. Главный научный сотрудник научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. Россия, Москва. 125183 Москва, абонентский ящик 108; ORCID 0009-0000-1451-6145; SPIN-код: 6743-2105; AuthorID: 740245.

Теряев Андрей Сергеевич. Генеральный директор научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. Россия, Москва. 126183 Москва, абонентский ящик 108; ORCID 0009-0005-8393-2093.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Волчек И.А. — теоретическое обоснование, практическое осуществление лабораторных исследований.

Теряев А.С. — разработка и практическое осуществление получения тестируемых фармацевтических субстанций.

ПОСТУПИЛА: 21.02.2023

ПРИНЯТА: 12.05.2023

ОПУБЛИКОВАНА: 27.06.2023