

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ ИЗ ПАТРИНИИ СРЕДНЕЙ НА МОБИЛИЗАЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК CD117+ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.В. Беляева, Д.И.Демид, В.Ю. Афонин, М.В. Анисович, П.Т. Петров, Д.И.Демид

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
ул. Академика В.Ф. Купревича, д. 5, к. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: Aleksandra447@yandex.ru

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) – это заболевания, которые стали одними из основных и наиболее распространенных причин нетрудоспособности, инвалидности и преждевременной смертности населения во многих странах мира. Развитие данных патологий обусловлено нарушениями нормального функционирования сердца и сосудов. В связи с этим в настоящее время разработка и создание новых более эффективных и безопасных препаратов для лечения ССЗ, а также исследование имеющихся лекарств по новому назначению является актуальным.

Основными компонентами патринии средней (*Patrinia intermedia*) являются сапонины, алкалоиды, эфирные масла, азотосодержащие основания. Используется патриния в медицине в основном в качестве седативного средства, превосходя в этом отношении валериановый корень. Также патриния назначается при невротении, неврозах, гастроэнтеритах, энтеритах, энтероколитах, заболеваниях лёгких, обладает противовоспалительной и снижающей болевые ощущения активностями. В ряде исследований было показано, что применение патринии является эффективным при лечении злокачественных опухолей [1 – 5].

Известно, что вещества патринии (сапонины, лигнины, производные олеаноловой кислоты) способны работать как регуляторы PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) и ингибиторы HDACs (histone deacetylases). К фармакологическим эффектам данных классов веществ относят способность мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) в костном мозге для последующего улучшения работы сердечно-сосудистой системы. Поэтому целью работы являлась оценка влияния патринии средней на число ЭПК, а также на молекулярно-биологические параметры (количество клеток с признаками апоптоза, микроядрами, распределение клеток по G₀/G₁, S, G₂/M фазам клеточного цикла) костного мозга и периферической крови животных.

Материалы и методы. Для проведения эксперимента использовались мыши линии C57Bl/6 весом 20 – 25г (самцы), которых разделили на 3 группы. Лабораторные животные содержались в следующих условиях: древесная подстилка, температура помещения 22 – 24 °С и 12-часовой режим смены освещения. В качестве пищи животные получали стандартный брикетированный корм, а также питьевую воду.

Мышам 2-х групп вводили перорально с помощью металлического зонда лекарственное сырьё (ЛС) из патринии средней в дозах 50 мг/кг и 200 мг/кг, растворенное в 1%-м растворе крахмала, ежедневно в течение 7 недель. Контрольной группе животных давали 1%-й раствор крахмала.

Сырьё на основе патринии средней было предоставлено лабораторией фармацевтических испытаний.

Был проведен анализ изменения числа стволовых клеток CD117+ в костном мозге и в периферической крови экспериментальных животных (использовали проточный цитофлуориметр Cytomics FC 500 «Beckman Coulter», США). Выделение «гейтов» клеток для анализа осуществляли по параметрам прямого и углового светорассеяния (FSC vs SSC), в смешанных линейно-логарифмических режимах (SSC vs FL1, FL2, FL3) или только с применением параметров флуоресценции с логарифмическим усилением сигнала (log/log). В каждом образце проводили сбор не менее 10 000 событий. Применяли коммерческие

моноклональные антитела («Beckman Coulter», США). Исследования проводились с одноцветными метками.

Также были изучены молекулярно-биологические параметры костного мозга и периферической крови экспериментальных животных. С помощью проточной цитофлуориметрии на основании гистограмм распределения ДНК в клетках был изучен процент апоптотических клеток, количество микроядер и клеток в G₀/G₁, S, G₂/M фазах клеточного цикла.

Анализ содержания ДНК проводили в клетках, предварительно фиксированных в этаноле. Образцы клеток отмывали дважды ФСБ (фосфатно-солевым буфером), фиксировали в охлажденном этаноле (70%) и хранили при -20⁰С до проведения эксперимента. Фиксированные в этаноле клетки отмывали ФСБ, обрабатывали раствором РНК-азы (150 Ед/мл) и окрашивали раствором PI (пропидиум иодид, 50 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы анализировались с помощью цитометрического анализа (использовали проточный цитофлуориметр Cytomics FC 500 «Beckman Coulter», США).

Количество клеток с признаками апоптоза рассчитывали на основании измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной иодистым пропидием (50 мкг/мл). Регистрировали апоптотические клетки с содержанием ДНК менее 2n.

Изучали морфометрические показатели: массу тела, абсолютную и относительную массы сердца. Массу тела измеряли взвешиванием животных на весах настольных циферблатных тип РН-10Ц13У. Весовые индексы сердца рассчитывались как отношение массы органа к массе тела животных в день выведения мышей из эксперимента:

$$\text{ОКМ} = \frac{A}{B} \times 1000, \text{ где}$$

ОКМ – относительный коэффициент массы органа;

A – масса органа;

B – масса тела.

Полученные результаты анализировались с помощью программы Statistica.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения исследования были изучены показатели числа стволовых клеток CD117+ в костном мозге и в периферической крови животных. Полученные данные представлены в таблице 1.

Было показано, что введение ЛС в дозе 50 мг/кг не привело к достоверному увеличению числа стволовых клеток с поверхностным клеточным маркером CD117+ в костном мозге и в крови мышей линии С57В1/6. При введении животным ЛС в дозе 200 мг/кг отмечалось значительное увеличение количества ЭПК в костном мозге и в периферической крови мышей по сравнению с контрольной группой животных (P<0,05).

Таблица 1 – Изменение количества стволовых клеток CD117+ в костном мозге и периферической крови мышей линии С57В1/6 при введении патринии средней

№	Группа	Количество стволовых клеток в костном мозге, %	Количество стволовых клеток в крови, %
1	Контроль	100	100
2	Патриния 50 мг/кг	104,32	107,50
3	Патриния 200 мг/кг	124,02	121,64
		P ₁₋₃ <0,05	P ₁₋₃ <0,05

В связи с вышеизложенным можно сделать вывод, что использование ЛС патринии средней в дозе 200 мг/кг достоверно оказывает влияние на мобилизацию клеток с CD117+ в костном мозге и приводит к увеличению числа ЭПК в крови мышей линии С57В1/6, в то

время как введение ЛС патринии средней в дозе 50 мг/кг не изменяет значения исследуемых показателей.

В ходе изучения молекулярно-биологических показателей костного мозга и периферической крови были получены следующие результаты (таблица 2 и 3).

Установлено, что использование ЛС не оказывает существенное влияние на пролиферативную способность клеток костного мозга. Так, показано, что количество клеток с признаками апоптоза и микроядрами не изменялось у опытных групп 1 и 2 по сравнению с контролем. Различия между исследуемыми показателями у животных, которые получали патринию среднюю в дозах 50 и 200 мг/кг, также отмечены не были. Распределение клеток по стадиям клеточного цикла соответствовало контрольным значениям (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты подсчёта молекулярно-биологических параметров костного мозга мышей линии C57Bl/6 при введении патринии средней

№	Группа	Апоптоз, %	Фазы клеточного цикла			Микроядра, %
			G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %	
1	Контроль	2,29±0,44	64,65±6,88	28,22±6,55	7,14±1,36	1,39±0,58
2	Патриния 50 мг/кг	2,23±0,34	71,21±4,0	21,4±3,73	7,39±1,38	1,48±0,39
3	Патриния 200 мг/кг	2,78±0,52	71,22±5,22	19,74±4,13	9,05±1,59	1,45±0,29

При анализе влияния ЛС патринии средней на молекулярно-биологические параметры периферической крови животных было выявлено изменение количества микроядер на фоне использования изучаемого вещества в дозе 200 мг/кг (таблица 3). Наблюдалось значительное снижение процента микроядер в группе 2 (5,34±2,31%) по сравнению с контролем (10,97±2,28%).

Таблица 3 – Результаты подсчёта молекулярно-биологических параметров периферической крови мышей линии C57Bl/6 при введении патринии средней

№	Группа	Апоптоз, %	Фазы клеточного цикла			Микроядра, %
			G ₀ /G ₁ , %	S, %	G ₂ /M, %	
1	Контроль	10,08±2,39	92,5±1,0	3,22±0,66	4,28±1,25	10,97±2,28
2	Патриния 50 мг/кг	8,26±2,54	92,11±1,73	4,18±2,0	3,72±1,32	7,88±3,21
3	Патриния 200 мг/кг	5,01±1,55	93,43±0,60	1,93±0,90	4,63±0,84	5,34±2,31
						P ₁₋₃ <0,05

Оценка относительной массы органов животных (к массе тела) является объективным показателем, который отражает в определенной степени физиологическое состояние организма. Абсолютные и относительные массы органов тела изменяются под воздействием внешних факторов. В проведенном нами исследовании были оценены относительные массы сердец, поскольку изменение данного показателя может указывать на отдалённые патологические процессы.

В результате проведенного анализа было установлено, что введение животным ЛС патринии средней не оказывает влияние на изменение ОКМ сердца (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты подсчёта ОКМ сердца мышей линии C57Bl/6 при введении патринии средней

Группы	m тела	m сердца	ОКМ
контрольная группа	28,80 ± 0,32	0,19 ± 0,01	6,78 ± 0,43
Патриния 50 мг/кг	27,03 ± 1,14	0,19 ± 0,02	7,00 ± 0,62
Патриния 200 мг/кг	31,26 ± 0,95	0,22 ± 0,02	6,98 ± 0,62

Заключение. В результате проведенных экспериментов показано, что изучаемое сырьё на основе патринии средней является эффективным в отношении увеличения числа стволовых клеток CD117+ у мышей линии C57Bl/6. В связи с этим ЛС может использоваться для эффективного лечения ССЗ. Также можно сделать вывод о безопасности данного вещества, поскольку в ходе исследований не были выявлены цитотоксические эффекты ЛС патринии средней.

Литература

1. Скляревский Л.Я., Губанов И.А. Лекарственные средства в быту. Изд. Россельхозиздат. 1969. 220 с.
2. Sagar S. Bachhav, Savita D. Patil, Mukesh S. Bhutada, Sanjay J. Surana. Oleanolic acid prevents glucocorticoid-induced hypertension in rats. *Phytother. Res.* 2011. V.25. P. 1435 – 1439.
3. Wonhwa Lee, Eun-Ju Yang, Sae-Kwang Ku, Kyung-Sik Song, Jong-Sup Bae. Anticoagulant activities of oleanolic acid via inhibition of tissue factor expression. 2012. V. 45. № 7. P. 390 – 395.
4. Zheng Y., Jin Y., Zhu H.B., Xu S.T. et al. The anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Patrinia villosa* and its mechanism on the proinflammatory cytokines of rats with pelvic inflammation. *Afr. J Tradit Complement Altern Med.* 2012. V. 9. № 3. P. 295 – 302.
5. Lu W.Z., Geng G.X., Li Q.W., Li J. et al. Antitumor activity of polysaccharides isolated from *Patrinia heterophylla*. *Pharm Biol.* 2010. V.48. № 9. P. 1012 – 1017.

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF CRUDE DRUG FROM *PATRINIA INTERMEDIA* ON THE MOBILIZATION OF STEM CELLS CD117+ AND MOLECULAR-BIOLOGICAL PARAMETERS IN THE EXPERIMENT

A.V. Beliaeva, D. I. Demid, V.Yu. Afonin, M.V. Anisovich, P.T. Petrov
The Institute of Bioorganic chemistry NAS of Belarus

Summary

At present study we describe the main cytogenetic properties of *Patrinia intermedia*. The crude drug from this plant influences on increasing of the number of stem cells CD117+ in bone marrow and peripheral blood in mice C57Bl/6. It is also shown that the crude drug from *Patrinia intermedia* doesn't display cytotoxic effects.