

**ЭФФЕКТ СОВМЕСТНОГО ВЛИЯНИЯ МЕТОТРЕКСАТА С
ФИТОЭКСТРАКТАМИ КЛЕВЕРА И ЦИКОРИЯ НА ПРОДУКЦИЮ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ *IN VITRO***

Михайлова И. В.¹,
Чайникова И. Н.¹,
Иванова Е. В.¹,
Синеговец А. А.¹

¹ Кафедра фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский
государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия.

**THE EFFECT OF JOINT INFLUENCE OF THE COMBINED EFFECT OF
METHOTREXATE WITH PHYTOEXTRACTS OF MEADOW CLOVER
AND COMMON CHICORY ON THE PRODUCTION OF PRO-
INFLAMMATORY CYTOKINES IN VITRO**

Mikhailova I. V.^a,
Chaynikova I. N.^a,
Ivanova E. V.^a,
Sinegovets A. A.^a

^a Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University,
Orenburg, Russian Federation.

Резюме

Введение. Одним из аспектов ограничения токсичности метотрексата (MTX) является использование средств растительного происхождения, для которых характерны такие свойства, как доступность, безопасность и высокая биологическая активность в сочетании с очень низкой токсичностью. Среди лекарственных растений, содержащих большой комплекс биологически активных веществ полифенольной природы и обладающих антиоксидантными, противовоспалительными, иммунокорригирующими и другими свойствами следует выделить клевер луговой и цикорий обыкновенный. Фитоэкстракты, полученные из данных растений, могут быть использованы для защиты в отношении иммунодепрессивного влияния метотрексата и усиления его противовоспалительных свойств без индукции токсичности MTX. В тоже время, необходимо отметить, что сведения о механизмах противовоспалительной активности индивидуальных фитоэкстрактов носят разнонаправленный характер.

Цель работы: оценка влияния фитоэкстрактов клевера и цикория на секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 мононуклеарными клетками периферической крови человека при метотрексат-индуцированной иммуносупрессии.

Материалы и методы. Сухие экстракты из травы клевера и травы цикория были получены методом перколяции с этиловым спиртом. Продукцию цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 в супернатантах нестимулированных и стимулированных конканавалином А (Кон А) культур мононуклеарных клеток периферической крови человека оценивали с использованием метода иммуноферментного анализа.

Результаты. Оценка иммунорегуляторной активности сухих экстрактов из травы клевера и цикория, а также их сочетаний с метотрексатом на модели мононуклеаров периферической крови человека показала, что фитоэкстракты подавляли продукцию провоспалительных цитокинов в системе *in vitro* как спонтанную (TNF α , IL-6), так и индуцированную (TNF α , IL-6 и IL-17). Следует отметить, что выраженность ингибирующего эффекта фитоэкстрактов не уступала, а в отношении отдельных цитокинов (TNF α и IL-17) превосходила фитопрепарат «Иммунал».

Выводы:

1. Установлено ингибирующее влияние фитоэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с MTX на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека - TNF α , IL-6, IL-17.
2. Показано потенцирующее влияние фитоэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика MTX в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNF α и IL-17.
3. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия MTX

обладал фитоекстракт цикория, при этом оба экстракта превосходили влияние препарата-сравнения «Иммунал».

Ключевые слова: метотрексат, фитоекстракт, клевер, цикорий, цитокины, мононуклеары периферической крови человека.

Abstract

Introduction. One of the aspects of limiting the toxicity of methotrexate (MTX) is the use of herbal remedies, which are characterized by such properties as availability, safety and high biological activity in combination with very low toxicity. Among the medicinal plants containing a large complex of biologically active substances of a polyphenolic nature and possessing antioxidant, anti-inflammatory, immunocorrective and other properties, meadow clover and common chicory should be singled out. Phytoextracts obtained from these plants can be used to protect against the immunosuppressive effect of methotrexate and enhance its anti-inflammatory properties without inducing MTX toxicity. At the same time, it should be noted that information on the mechanisms of anti-inflammatory activity of individual phytoextracts is multidirectional.

The aim of the work: to evaluate the effect of clover and chicory phytoextracts on the secretion of proinflammatory cytokines TNF α , IL-6 and IL-17 by human peripheral blood mononuclear cells under methotrexate-induced immunosuppression.

Materials and methods. Dry extracts from clover grass and chicory grass were obtained by percolation with ethyl alcohol. The production of cytokines TNF α , IL-6 and IL-17 in the supernatants of unstimulated and concanavalin A (Con A) stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures was assessed using the enzyme immunoassay method.

Results. Evaluation of the immunoregulatory activity of dry extracts from clover and chicory grass, as well as their combinations with methotrexate on the model of human peripheral blood mononuclear cells showed that the phytoextracts suppressed the production of proinflammatory cytokines in the in vitro system, both spontaneous (TNF α , IL-6) and induced (TNF α , IL-6 and IL-17). It should be noted that the severity of the inhibitory effect of phytoextracts was not inferior, and in relation to individual cytokines (TNF α and IL-17) was superior to the phytopreparation «Immunal».

Conclusions:

1. The inhibitory effect of clover and chicory phytoextracts, as well as their combinations with MTX on the production of proinflammatory cytokines by human peripheral blood mononuclear leukocytes - TNF α , IL-6, IL-17 was established.
2. The potentiating effect of phytoextracts on enhancing the inhibitory effect of the cytostatic MTX on the production of IL-6 by lymphocytes and the appearance of an anti-inflammatory effect on TNF α and IL-17 was shown.
3. The most pronounced immunoregulatory and potentiating effect on the anti-inflammatory effect of MTX was demonstrated by the chicory phytoextract, with both extracts exceeding the effect of the comparison drug «Immunal».

Keywords: methotrexate, phytoextract, clover, chicory, cytokines, mononuclears of human peripheral blood.

1 Введение

В последние годы расширяется диапазон заболеваний, при лечении которых метотрексат (MTX) используется как препарат первой линии и/или как основное и дополнительное лекарственное средство. Первоначально разработанный как противоопухолевый препарат, MTX в настоящее время благодаря его противовоспалительному, антиметаболитному, иммуномодулирующему действию применяется при лечении ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, псориаза, при воспалительных заболеваниях кишечника, рассеянном склерозе, васкулите, системной красной волчанке и многих других заболеваниях соединительной ткани и кожи [7]. Однако, одним из факторов, ограничивающих применение MTX, является его токсическое действие, в том числе способность индуцировать окислительный стресс, гепатотоксичность, нефротоксичность, иммуносупрессию и др. [6, 12].

Одним из аспектов ограничения токсичности подобных препаратов является использование средств растительного происхождения, являющихся доступными, безопасными и обладающими высокой биологической активностью, включая способность потенцировать эффект лечебных препаратов. Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) и цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) и экстракты, полученные из этих растений, содержат большой комплекс биологически активных веществ (БАВ) полифенольной природы, обладающих антиоксидантными, противовоспалительными, иммунокорректирующими и др. свойствами [1, 2, 5]. Вместе с тем, разрозненный характер сведений о механизмах противовоспалительной активности индивидуальных фитоэкстрактов, связанный с особенностями их выделения, а также очистки и стандартизации фитопрепаратов, ограничивает возможности целенаправленного поиска БАВ с противовоспалительной активностью в используемых и перспективных лекарственных растениях. Следует также отметить, что вопрос о защитном влиянии экстрактов цикория и клевера в отношении иммунодепрессивного влияния метотрексата остается открытым. **Целью работы** явилась оценка влияния фитоэкстрактов клевера и цикория на секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 мононуклеарными клетками периферической крови человека при метотрексат-индуцированной иммуносупрессии.

2 Материалы и методы

Объектами исследования послужили сухие экстракты из травы клевера лугового и травы цикория обыкновенного, полученные методом перколяции [3, 4]. Периферические мононуклеарные клетки (ПМК) выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400g) в градиенте плотности фиколл-верографин («Pharmacia», Швеция) плотностью 1,077г/см³. Базовая (нестимулированная) продукция провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-17 исследовалась в культуре мононуклеаров, сокультивируемых с водными растворами фитоэкстрактов (2,0 мг/мл) с добавлением метотрексата (MTX, «Сандоз»,

Словения; лекарственная форма – раствор для инъекций) в концентрации 10,0 мкг/мл (опыт 1) и без МТХ (опыт 2). Для оценки индуцированной продукции исследуемых провоспалительных цитокинов к лимфоцитам добавляли конканавалин А (Кон А) («ПанЭко», Россия) в концентрации 20,0 мкг/мл. В качестве контроля были использованы пробы, где к периферическим мононуклеарам добавлялась только культуральная среда (контроль 1) или культуральная среда с Кон А (контроль 2). После 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37,0°C в атмосфере 5,0% CO₂ в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10,0% фетальной сыворотки («ПанЭко», Россия) и 80,0 мкг/мл гентамицина собирали культуральную жидкость и замораживали (-20°C). Исследования проводили в 3 дублях для каждого исследуемого образца. Уровень спонтанной и индуцированной продукции цитокинов после сокультивирования лимфоцитов с водными растворами фитоэкстрактов исследовали методом ИФА («Цитокин», Россия) с регистрацией результатов на фотометре Multiskan («Labsystems», Финляндия), длина волны 492 нм. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA) с оценкой различий между величинами по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

3 Результаты и обсуждение

Оценка иммунорегуляторной активности сухих экстрактов травы клевера и цикория на модели мононуклеаров периферической крови человека показала, что фитоэкстракты подавляли продукцию провоспалительных цитокинов в системе *in vitro* как спонтанную (TNF α , IL-6), так и индуцированную (TNF α , IL-6 и IL-17). Следует отметить, что выраженность ингибирующего эффекта фитоэкстрактов не уступала, а в отношении отдельных цитокинов (TNF α и IL-17) превосходила фитопрепарат «Иммунал». Так, добавление в среду культивирования ПМК фитоэкстракта клевера и цикория сопровождалось снижением базовой и индуцированной продукции ключевого провоспалительного цитокина TNF α в 2 и 4 раза относительно контролей лимфоцитов ($136,5 \pm 13,8$ пг/мл и $239,9 \pm 24,2$ пг/мл, соответственно, $p < 0,05$). Напротив, препарат «Иммунал» оказывал стимулирующее влияние на базовую продукцию TNF α ($191,2 \pm 14,5$ пг/мл), не изменяя индуцированную секрецию.

В отношении IL-6 эффекты исследуемых образцов были однонаправленными и характеризовались подавлением базовой и индуцированной продукции цитокина лимфоцитами, но отличались по уровню выраженности влияния. Добавление к периферическим мононуклеарам «Иммунала» приводило к незначительному снижению уровня IL-6 (на 18,0 – 30,5%) относительно контролей ($433,7 \pm 16,0$ пг/мл и $469,0 \pm 18,5$ пг/мл, соответственно, $p < 0,05$). Внесение в культуральную среду экстракта клевера сопровождалось уменьшением продукции IL-6 в 2 раза у нестимулированных лимфоцитов и в 3 раза у индуцированных клеток. Наиболее сильное ингибирующее влияние на продукцию лимфоцитами

цитоклина оказывал фитоекстракт цикория, снижающий уровень IL-6 в 20 раз, независимо от присутствия в среде Кон А.

Содержание другого провоспалительного цитокина IL-17 в культуральной среде нестимулированных лимфоцитов в присутствии обоих фитоекстрактов и «Иммунала» не отличалось от уровня базовой секреции данного цитокина и соответствовало значениям контроля ($38,3 \pm 4,5$ пг/мл). Вместе с тем, внесение исследуемых образцов в среду индуцированных Кон А лимфоцитов приводило к двухкратному снижению продукции IL-17 под влиянием «Иммунала» и к двадцатикратному – в присутствии обоих фитоекстрактов по сравнению с контролем 1 ($631,7 \pm 58,3$ пг/мл, $p < 0,05$).

Анализ сочетанного влияния фитоекстрактов и «Иммунала» совместно с МТХ позволил установить их ингибирующий эффект в отношении продукции TNF α , IL-6 и IL-17 лимфоцитами, при этом более выраженным потенцирующим действием обладал образец из сухой травы цикория. В предварительных исследованиях было установлено отсутствие влияния самого МТХ в концентрации 10,0 мкг/мл в отношении базовой и стимулированной продукции TNF α и IL-17. Вместе с тем, МТХ способствовал снижению уровня IL-6 до $358,0 \pm 29,5$ пг/мл в среде с не стимулированными ПМК и до $367,0 \pm 32,0$ пг/мл – с лимфоцитами, индуцированными Кон А. При внесении в культуральную среду «Иммунала» с МТХ отмечалась синергидность их противовоспалительного эффекта, но только для продукции TNF α и IL-17. В отношении TNF α установлено появление ингибирующего воздействия обоих образцов, для IL-17 – усиление эффекта на два порядка в сравнении с непосредственным влиянием «Иммунала» ($631,7 \pm 58,3$ пг/мл до $250,1 \pm 21,4$ пг/мл и $130,7 \pm 18,9$ пг/мл, соответственно, $p < 0,05$). В отношении базовой и стимулированной продукции IL-6 сочетанный противовоспалительный эффект не отмечался и соответствовал влиянию препаратов в отдельности.

В сочетании с фитоекстрактом клевера на порядок усиливался противовоспалительный эффект МТХ в отношении базовой и стимулированной продукции TNF α и IL-6 ($p < 0,05$). Для IL-17 ингибирующий эффект соответствовал влиянию отдельно взятому образцу клевера на продукцию индуцированных лимфоцитов. Добавление к периферическим мононуклеарам цитостатика МТХ с фитоекстрактом цикория сопровождалось двухкратным (в сравнении с контролем лимфоцитов – $77,4 \pm 11,0$ пг/мл и $81,5 \pm 6,5$ пг/мл, $p < 0,05$) снижением продукции TNF α и многократным (в 19-20 раз в сравнении с контролем, $p < 0,05$) подавлением продукции IL-6 и IL-17 как у нестимулированных лимфоцитов, так и индуцированных Кон А.

Таким образом, было установлено ингибирующее влияние фитоекстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с МТХ на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека – TNF α , IL-6, IL-17. Показано потенцирующее влияние фитоекстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика МТХ в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и

132 появление противовоспалительного влияния в отношении $\text{TNF}\alpha$ и IL-17.
133 Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в
134 отношении противовоспалительного воздействия МТХ обладал фитоекстракт
135 цикория, однако оба экстракта превосходили влияние известного
136 фитопрепарата на основе *Echinacea purpurea* L.

137 Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что в ранее
138 проведенных работах было установлено, что исследуемое сырье *Trifolium*
139 *pratense* L. и *Cichorium intybus* L. и полученные из него экстракты содержат
140 БАВ полифенольной природы - флавоноиды, гидроксикоричные кислоты и
141 фенольные кислоты [2, 5]. Иммунорегуляторная активность фенольных
142 соединений в системах *in vitro* может быть реализована различными
143 механизмами, включая ингибирование воспалительных путей через NF- κ B и
144 STAT3, инфламмасому NLRP3 и, как следствие, снижения экспрессии
145 провоспалительных генов в иммунокомпетентных клетках, уровня
146 флоготенных цитокинов, ограничение окислительного стресса [7, 10, 11].

147 Особый интерес представляет потенциальное использование
148 фитоекстрактов совместно с метотрексатом, являющимся «золотым
149 стандартом» лечения системных иммуновоспалительных заболеваний
150 человека [8, 14]. Полученные в нашей работе данные совпадают с рядом
151 литературных [7], где показано, что МТХ снижает экспрессию $\text{TNF-}\alpha$, IL1 β , а
152 также экспрессию IL-17 и IFN γ в Т-клетках, культивируемых совместно с
153 синовиальными фибробластами при ревматоидном артрите [15]. Лечение
154 МТХ также приводило к снижению продукции провоспалительных
155 моноцитарных/макрофагальных цитокинов (IL1 β , IL6 и $\text{TNF-}\alpha$), увеличивало
156 экспрессию гена противовоспалительных цитокинов Th2 (IL-4 и IL-10).
157 Предполагают, что основной механизм влияния на провоспалительные
158 цитокины был связан с преимущественным действием на путь NF- κ B, а не
159 через аденозиновые рецепторы. Вместе с тем, в других работах показано, что
160 МТХ был полностью неактивен в отношении продукции IL-6 мононуклеарами
161 даже в больших дозах [13]. В серии экспериментов *in vitro* также не было
162 обнаружено ингибирующего влияния МТХ на эффекторные цитокины, но
163 показан выраженный ингибирующий эффект на пролиферацию Т-клеток [9].
164 Авторы считали, что противовоспалительная эффективность МТХ, вероятно,
165 была опосредована ингибированием пролиферации и выживания
166 активированных провоспалительных CD4 и CD8 Т-клеток. Вместе с тем в
167 литературе отсутствуют сведения о возможном сочетанном
168 провоспалительном эффекте МТХ с экстрактами клевера и цикория, что может
169 способствовать снижению дозы МТХ для получения терапевтического
170 эффекта препарата.

171 4 Выводы:

172 1. Установлено ингибирующее влияние фитоекстрактов клевера и
173 цикория, а также их сочетаний с МТХ на продукцию провоспалительных
174 цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека -
175 $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-17.

2. Показано потенцирующее влияние фитоэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика МТХ в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNF α и IL-17.

3. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия МТХ обладал фитоэкстракт цикория, при этом оба экстракта превосходили влияние препарата-сравнения «Иммунал».

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Синеговец А.А. – ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия;

адрес: Оренбургская область, Шарлыкский район, село Шарлык, переулок Школьный, дом 50, 461450;

телефон: 8(922)845-07-00;

e-mail: a.a.sinegovets@yandex.ru

Sinegovets A.A., Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation;

ADDRes: Orenburg region, Sharlyk district, Sharlyk village, Shkolny lane, building 50, 461450;

telephone: 8(922)845-07-00;

e-mail: a.a.sinegovets@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Михайлова И.В. – д.б.н., доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия;

Mikhailova I.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation;

Чайникова И.Н., д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия;

Chaynikova I.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation;

Иванова Е.В., д.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург, Россия;

Ivanova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

ЭФФЕКТ СОВМЕЩНОГО ВЛИЯНИЯ МЕТОТРЕКСАТА С
ФИТОЭКСТРАКТАМИ КЛЕВЕРА И ЦИКОРИЯ НА ПРОДУКЦИЮ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ *IN VITRO*

THE EFFECT OF JOINT INFLUENCE OF THE COMBINED EFFECT OF
METHOTREXATE WITH PHYTOEXTRACTS OF MEADOW CLOVER AND
COMMON CHICORY ON THE PRODUCTION OF PRO-INFLAMMATORY
CYTOKINES IN VITRO

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВЛИЯНИЕ ФИТОЭКСТРАКТОВ НА ЦИТОКИНЫ
EFFECT OF PHYTOEXTRACTS ON CYTOKINES

Ключевые слова: метотрексат, фитоекстракт, клевер, цикорий, цитокины, мононуклеары периферической крови человека.

Keywords: methotrexate, phytoextract, clover, chicory, cytokines, mononuclears of human peripheral blood.

Иммунологические чтения в Челябинске

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 0.

28.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском языке	Полный интернет адрес статьи или DOI
1.	Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода <i>Trifolium</i> L. Структурное разнообразие и биологическая активность // Химия растительного сырья. –2017. – №3. – С. 39-53.	Drenin A.A., Botirov E.H. Flavonoids and isoflavonoids of plants of the genus <i>Trifolium</i> L. Structural diversity and biological activity. Chemistry of plant raw materials, 2017, no. 3, pp. 39-53.	DOI: 10.14258/jcprm.2017031646
2.	Михайлова И.В., Синеговец А.А., Бондаренко А.И., Иванова Е.В. Фитохимическая характеристика и антиоксидантные свойства травы клевера лугового, произрастающего на территории оренбургской области // Медико-фармацевтический журнал "Пульс". 2023;25(1):29-33.	Mikhailova I.V., Sinegovets A.A., Bondarenko A.I., Ivanova E.V. Phytochemical characteristics and antioxidant properties of the herb of meadow clover growing on the territory of the Orenburg region // Medical & pharmaceutical journal "Pulse". – 2023;25(1):29-33.	http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-2-29-33

3.	Патент №2828665 Российская Федерация, МПК A61K 36/48 A61P 37/02 A61P 39/06 B01D 11/02. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью, на основе травы <i>Trifolium pratense</i> L.: №2023131553 : заявл. 28.11.2023 : опубл. 15.10.2024 / Михайлова И.В., Иванова Е.В., Синеговец А.А, Смолягин А.И., Кузьмичева Н.А. ; заявитель ФГБОУ ВО «ОрГМУ» Минздрава РФ. 9 с. : ил. // Yandex.ru : патенты.	Patent №2828665 Russian Federation, IPC A61K 36/48 A61P 37/02 A61P 39/06 B01D 11/02. Method for producing an agent with antioxidant and immunomodulatory activity based on the herb <i>Trifolium pratense</i> L.: №2023131553: declared 28.11.2023: published 15.10.2024 / Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Sinegovets A.A., Smolyagin A.I., Kuzmicheva N.A.; applicant FGBOU VO "Orsk State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation. 9 p.: ill. // Yandex.ru: patents.	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=73412173
4.	Патент №2803502 Российская Федерация, МПК A61K 36/28, A61P 37/02, A61P 39/06, B01D 11/02. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью. №2022131332; заявл. 29.11.2022 : опубл. 14.09.2023 / Михайлова И.В.,	Patent No. 2803502 Russian Federation, IPC A61K 36/28, A61P 37/02, A61P 39/06, B01D 11/02. Method for producing an agent with antioxidant and immunomodulatory activity. No. 2022131332; declared 29.11.2022 : published 14.09.2023 / Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Smolyagin A.I., Bondarenko	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54659799

	Иванова Е.В., Смолягин А.И., Бондаренко А.А., Синеговец А.А., Кузьмичева Н.А., Филиппова Ю.В., Воронкова И.П., Винокурова Н.В. ; заявитель ФГБОУ ВО «ОрГМУ» Минздрава РФ. 10 с. : ил. // Yandex.ru : патенты.	A.A., Sinegovets A.A., Kuzmicheva N.A., Filippova Yu.V., Voronkova I.P., Vinokurova N.V.; applicant FSBEI HE "Orsk State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation. 10 p. : ill. // Yandex.ru: patents.	
5.	Синеговец А.А., Михайлова И.В., Иванова Е.В., Кузьмичева Н.А. Подбор оптимальных параметров экстрагирования фенольных соединений из травы цикория обыкновенного // Медико-фармацевтический журнал "Пульс".– 2023, Т.25, № 8. –С.58-67.	Sinegovets A.A., Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Kuzmicheva N.A. Selection of optimum parameters for extraction of phenolic compounds from the herb of Cichorium intybus L. Medical & pharmaceutical journal "Pulse", 2023, Vol.25, no. 8, pp.58-67	http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-2-29-33
6.	Фролов Б.А., Калинина О.В., Кириллова А.В., Штиль А.А. Преодоление гепатотоксичности метотрексата: роль тритерпеноидов // Клиническая онкогематология. – 2013. – Т. 6, №1. – С. 1– 10.	Frolov B.A., Kalinina O.V., Kirillova A.V., Shtil A.A. Overcoming the hepatotoxicity of methotrexate: the role of triterpenoids. Clinical Hematology. 2013, Vol. 6, No. 1, pp. 1-10.	https://elibrary.ru/item.asp?id=22548235

7.	Bedoui Y., Guillot X., Sélambarom J., Guiraud P., Giry C., Jaffar-Bandjee M.C., Ralandison S., Gasque P. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. International Journal of Molecular Sciences, 2019, Vol. 20, no. 20, pp.5023	Bedoui Y., Guillot X., Sélambarom J., Guiraud P., Giry C., Jaffar-Bandjee M.C., Ralandison S., Gasque P. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. International Journal of Molecular Sciences, 2019, Vol. 20, no. 20, pp.5023	https://doi.org/10.3390/ijms20205023
8.	Cronstein B.N., Aune T.M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. Nat. Rev. Rheumatol., 2020, Vol.16, no.3, pp. 145–154	Cronstein B.N., Aune T.M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. Nat. Rev. Rheumatol., 2020, Vol.16, no.3, pp. 145–154	https://doi.org/10.1038/s41584-020-0373-9
9.	Freeman ML, Clagett BM, Moisi D, Yeh E, Morris CD, Ryu A, Rodriguez B, Stein JH, Deeks SG, Currier JS, Hsue PY, Anthony DD, Calabrese LH, Ribaldo HJ, Lederman MM. Methotrexate Inhibits T Cell Proliferation but Not Inflammatory Cytokine Expression to Modulate Immunity in People Living With HIV. Front Immunol. 2022, Vol.13:924718.	Freeman ML, Clagett BM, Moisi D, Yeh E, Morris CD, Ryu A, Rodriguez B, Stein JH, Deeks SG, Currier JS, Hsue PY, Anthony DD, Calabrese LH, Ribaldo HJ, Lederman MM. Methotrexate Inhibits T Cell Proliferation but Not Inflammatory Cytokine Expression to Modulate Immunity in People Living With HIV. Front Immunol. 2022, Vol.13:924718.	DOI: 10.3389/fimmu.2022.924718

10.	Hosseinzade A., Sadeghi O., Naghdipour Biregani A., Soukhtehzari S., Brandt G.S., Esmailzadeh A. Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. Frontiers in immunology, 2019, no 10, pp. 41-51.	Hosseinzade A., Sadeghi O., Naghdipour Biregani A., Soukhtehzari S., Brandt G.S., Esmailzadeh A. Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. Frontiers in immunology, 2019, no 10, pp. 41-51.	DOI: 10.3389/fimmu.2019.00051
11.	Martínez G., Mijares M.R., De Sanctis J.B. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. Recent Pat. Inflamm Allergy Drug Discov. 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 84-104	Martínez G., Mijares M.R., De Sanctis J.B. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. Recent Pat. Inflamm Allergy Drug Discov. 2019, Vol. 13, no. 2, pp. 84-104	DOI: 10.2174/1872213X13666190426164124
12.	Miyazono, Y., Gao, F., & Horie, T. (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. Scandinavian journal of gastroenterology, 39(11), 1119–1127.	Miyazono, Y., Gao, F., & Horie, T. (2004). Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. Scandinavian journal of gastroenterology, 39(11), 1119–1127.	https://doi.org/10.1080/00365520410003605
13.	Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T. Effects of FK506 and	Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T. Effects of FK506 and	DOI: 10.1016/s1567-5769(01)00008-x

	other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production in vitro. Int Immunopharmacol. 2001 Apr;1(4):749-57.	other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production in vitro. Int Immunopharmacol. 2001 Apr;1(4):749-57.	
14.	Shinde C. G., Venkatesh M. P., Kumar T. M., Shivakumar H. G. Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. Journal of pain & palliative care pharmacotherapy, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 351–358	Shinde C. G., Venkatesh M. P., Kumar T. M., Shivakumar H. G. Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. Journal of pain & palliative care pharmacotherapy, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 351–358	https://doi.org/10.3109/15360288.2014.959238
15.	Xu W., Wu H., Tahara K., Chen S., Wang X., Tanaka S., Sugiyama K., Sawada T., Hirano, T. Effects of vitamin K2 combined with methotrexate against mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. Fundamental & clinical pharmacology, 2021, Vol. 35, no. 5, pp.832–842	Xu W., Wu H., Tahara K., Chen S., Wang X., Tanaka S., Sugiyama K., Sawada T., Hirano, T. Effects of vitamin K2 combined with methotrexate against mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells of healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. Fundamental & clinical pharmacology, 2021, Vol. 35, no. 5, pp.832–842	https://doi.org/10.1111/fcp.12676