

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

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

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Оренбург, Россия

Резюме. 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 MTX и усиления его противовоспалительных свойств без индукции токсичности MTX. В то же 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 MTX-индуцированной иммуносупрессии. 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. Оценка иммунорегуляторной активности сухих экстрактов из травы клевера и цикория, а также их сочетаний с MTX 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». Установлено ингибирующее влияние фитоэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с MTX на продукцию провоспалительных

Адрес для переписки:

Синеговец Ангелина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Советская, б.
Тел.: 8 (922) 845-07-00.
E-mail: a.a.sinegovets@yandex.ru

Address for correspondence:

Angelina A. Sinegovets
Orenburg State Medical University
6 Sovetskaya St
Orenburg
460000 Russian Federation
Phone: +7 (922) 845-07-00.
E-mail: a.a.sinegovets@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Михайлова, И.Н. Чайникова, Е.В. Иванова, А.А. Синеговец «Эффект совместного влияния метотрексата с фитоэкстрактами клевера и цикория на продукцию провоспалительных цитокинов *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 475-480.
doi: 10.46235/1028-7221-17163-CEO

© Михайлова И.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Mikhailova, I.N. Chaynikova, E.V. Ivanova, A.A. Sinegovets "Combined effect of methotrexate and phytoextracts of meadow clover and common chicory on the *in vitro* production of pro-inflammatory cytokines", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 475-480.
doi: 10.46235/1028-7221-17163-CEO

© Mikhailova I.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17163-CEO

тического 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 МТХ, является его токсическое действие, в том числе способность индуцировать окислительный стресс, гепатоксичность, 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 фитοэкстрактов, связанный с особенностями их выделения, а также очистки и стандартизации фитοпрепаратов, 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 МТХ остается открытым. **Целью работы** явилась оценка влияния фитοэкстрактов клевера и цикория на секрецию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 мононуклеарными клетками периферической крови человека при МТХ-индуцированной иммуносупрессии.

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 (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077 г/см³. Базовая (нестимулированная) продукция провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IL-17 исследовалась в культуре мононуклеаров, сокультивируемых с водными растворами фитοэкстрактов (2,0 мг/мл) с добавлением МТХ (Sandoz, 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) (НПП «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 (НПП «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 фитοэкстрактов исследовали методом ИФА (ООО «Цитокин», Россия) с регистрацией результатов на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия), длина волны 492 нм. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, США) с оценкой различий между величинами по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Оценка иммунорегуляторной активности сухих экстрактов травы клевера и цикория на модели мононуклеаров периферической крови человека показала, что фитοэкстракты 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 фитοэкстрактов не уступала, а в отношении отдельных цитокинов (TNF α и IL-17) превосходила фитοпрепарат «Иммунал». Так, добавление в среду культивирования ПМК фитοэкстракта 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 ИЛ-6 в 2 раза у нестимулированных лимфоцитов и в 3 раза у индуцированных клеток. Наиболее сильное ингибирующее влияние на продукцию лимфоцитами цитокина оказывал фитоэкстракт цикория, снижающий уровень ИЛ-6 в 20 раз, независимо от присутствия в среде Кон А.

Содержание другого провоспалительного цитокина ИЛ-17 в культуральной среде нестимулированных лимфоцитов в присутствии обоих фитоэкстрактов 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 двукратному снижению продукции ИЛ-17 под влиянием «Иммунала» и к двадцатикратному – в присутствии обоих фитоэкстрактов по сравнению с контролем 1 ($631,7 \pm 58,3$ пг/мл, $p < 0,05$).

Анализ сочетанного влияния фитоэкстрактов и «Иммунала» совместно с МТХ позволил установить их ингибирующий эффект в отношении продукции TNF α , ИЛ-6 и ИЛ-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 ИЛ-17. Вместе с тем МТХ способствовал снижению уровня ИЛ-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 ИЛ-17. В отношении TNF α установлено появление ингибирующего воздействия обоих образцов, для ИЛ-17 – усиление эффекта на два порядка в сравнении с непосредственным влиянием «Иммунала» (с $631,7 \pm 58,3$ 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 ИЛ-6 сочетанный противовоспалительный эффект не отмечался и соответствовал влиянию препаратов в отдельности.

В сочетании с фитоэкстрактом клевера на порядок усиливался противовоспалительный эффект МТХ в отношении базовой и стимулированной продукции TNF α и ИЛ-6 ($p < 0,05$). Для ИЛ-17 ингибирующий эффект соответствовал влиянию отдельно взятому образцу клевера на продукцию индуцированных лимфоцитов. Добавление

к периферическим мононуклеарам цитостатика МТХ с фитоэкстрактом цикория сопровождалось двукратным (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 ИЛ-6 и ИЛ-17 как у нестимулированных лимфоцитов, так и индуцированных Кон А.

Таким образом, было установлено ингибирующее влияние фитоэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с МТХ на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека – TNF α , ИЛ-6, ИЛ-17. Показано потенцирующее влияние фитоэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика МТХ в отношении продукции лимфоцитами ИЛ-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNF α и ИЛ-17. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия МТХ обладал фитоэкстракт цикория, однако оба экстракта превосходили влияние известного фитопрепарата на основе *Echinacea purpurea* L.

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

Особый интерес представляет потенциальное использование фитоэкстрактов совместно с МТХ, являющимся золотым стандартом лечения системных иммуновоспалительных заболеваний человека [8, 14]. Полученные в нашей работе данные совпадают с рядом литературных [7], где показано, что МТХ снижает экспрессию TNF α , ИЛ-1 β , а также экспрессию ИЛ-17 и IFN γ в Т-клетках, культивируемых совместно с синовиальными фибробластами при ревматоидном артрите [15]. Лечение МТХ также приводило к снижению продукции провоспалительных моноцитарных/макрофагальных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF α), увеличивало экспрессию гена противовоспалительных цитокинов Th2 (ИЛ-4 и ИЛ-10). Предполагают, что основной механизм

влияния на провоспалительные цитокины был связан с преимущественным действием на путь NF-κB, а не через аденозиновые рецепторы. Вместе с тем в других работах показано, что МТХ был полностью неактивен в отношении продукции IL-6 мононуклеарами даже в больших дозах [13]. В серии экспериментов *in vitro* также не было обнаружено ингибирующего влияния МТХ на эффекторные цитокины, но показан выраженный ингибирующий эффект на пролиферацию Т-клеток [9]. Авторы считали, что противовоспалительная эффективность МТХ, вероятно, была опосредована ингибированием пролиферации и выживания активированных провоспалительных CD4 и CD8 Т-клеток. Вместе с тем в литературе отсутствуют сведения о возможном сочетанном провоспалительном эффекте МТХ с экстрактами клевера и цикория, что может способствовать снижению дозы МТХ для получения терапевтического эффекта препарата.

Выводы

1. Установлено ингибирующее влияние фитοэкстрактов клевера и цикория, а также их сочетаний с МТХ на продукцию провоспалительных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови человека – TNFα, IL-6, IL-17.
2. Показано потенцирующее влияние фитοэкстрактов на усиление ингибирующего эффекта цитостатика МТХ в отношении продукции лимфоцитами IL-6 и появление противовоспалительного влияния в отношении TNFα и IL-17.
3. Наиболее выраженным иммунорегуляторным и потенцирующим эффектом в отношении противовоспалительного воздействия МТХ обладал фитοэкстракт цикория, при этом оба экстракта превосходили влияние препарата сравнения «Иммунал».

Список литературы / References

1. Дренин А.А., Ботиров Э.Х. Флавоноиды и изофлавоноиды растений рода *Trifolium 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 *Trifolium L.* Structural diversity and biological activity. *Khimiya rastitel'nogo syrya = Chemistry of Plant Raw Materials*, 2017, no. 3, pp. 39-53. (In Russ.)]
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, Т. 25, № 1. С. 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. *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal "Puls" = Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 29-33. (In Russ.)]
3. Михайлова И.В., Иванова Е.В., Синеговец А.А., Смолягин А.И., Кузьмичева Н.А. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью, на основе травы *Trifolium pratense L.* Патент RU 2828665 С1, 15.10.2024. [Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Sinegovets A.A., Smolyagin A.I., Kuzmicheva N.A. Method for producing an agent with antioxidant and immunomodulatory activity based on the herb *Trifolium pratense L.* Patent RU 2828665 С1, 15.10.2024].
4. Михайлова И.В., Иванова Е.В., Смолягин А.И., Бондаренко А.А., Синеговец А.А., Кузьмичева Н.А., Филиппова Ю.В., Воронкова И.П., Винокурова Н.В. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью. Патент RU 2803502 С1, 14.09.2023. [Mikhailova I.V., Ivanova E.V., Smolyagin A.I., Bondarenko A.A., Sinegovets A.A., Kuzmicheva N.A., Filippova Yu.V., Voronkova I.P., Vinokurova N.V. Method for producing an agent with antioxidant and immunomodulatory activity. Patent RU 2803502 С1, 14.09.2023].
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.* *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal "Puls" = Medical and Pharmaceutical Journal "Pulse"*, 2023, Vol. 25, no. 8, pp. 58-67. (In Russ.)]
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. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Hematology*. 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 1-10. (In Russ.)]
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. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 20, 5023. doi: 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.

9. Freeman M.L., Clagett B.M., Moisi D., Yeh E., Morris C.D., Ryu A., Rodriguez B., Stein J.H., Deeks S.G., Currier J.S., Hsue P.Y., Anthony D.D., Calabrese L.H., Ribaud H.J., Lederman M.M. 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. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 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.
12. Miyazono Y., Gao F., Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004, Vol. 39, no. 11, pp. 1119-1127.
13. Sakuma S., Kato Y., Nishigaki F., Magari K., Miyata S., Ohkubo Y., Goto T. Effects of FK506 and other immunosuppressive anti-rheumatic agents on T cell activation mediated IL-6 and IgM production *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.*, 2001, Vol. 1, no. 4, pp. 749-757.
14. Shinde C.G., Venkatesh M.P., Kumar T.M., Shivakumar H.G. Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.*, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 351-358.
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. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2021, Vol. 35, no. 5, pp. 832-842.

Авторы:

Михайлова И.В. — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

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

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

Синеговец А.А. — ассистент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Authors:

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

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

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

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

Поступила 28.03.2025

Отправлена на доработку 18.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 28.03.2025

Revision received 18.04.2025

Accepted 25.05.2025