

ИММУНОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 615.32:582.739:615.375

EDN: WJNIPS

doi: 10.17072/1994-9952-2026-1-102-111



Исследование сухих экстрактов клевера и цикория с оценкой их влияния на фенотип спленоцитов мышей при метотрексат-индуцированной иммуносупрессии

А. А. Синеговец¹, И. В. Михайлова¹, А. И. Смолягин¹, А. А. Черникова¹,
Н. В. Винокурова¹

¹ Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ангелина Анатольевна Синеговец, a.a.sinegovets@yandex.ru

Аннотация. Исследование количественного содержания фенольных соединений и выраженности общей антиоксидантной активности изучаемых сухих экстрактов показало, что уровень фенольных соединений в экстракте клевера в пересчете на рутин составил $6.50 \pm 0.01\%$, выраженность антиоксидантной активности – $47.64 \pm 2.15\%$, в экстракте цикория накопление фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту составило $8.24 \pm 0.01\%$, а выраженность антиоксидантной активности – $62.67 \pm 1.85\%$. Было определено, что сухие экстракты клевера и цикория не обладают выраженной токсичностью, являются веществами 5 класса в соответствии с ГОСТом 32644-2014 и могут применяться в дальнейших исследованиях. Изучение влияния сухих экстрактов на массу мышей и селезенки, число спленоцитов, селезеночный индекс, отношение количества спленоцитов к массе животного и массе селезенки, а также на фенотип спленоцитов показало, что введение экстрактов не вызывало статистически значимых отклонений от показателей интактной группы и группы мышей, получавших препарат сравнения «Иммунал». В то же время метотрексат оказывал выраженное иммуносупрессивное влияние, снижая общую массу мышей и массу селезенки в частности, а также число спленоцитов совместно с отношением количества спленоцитов к массе животного и массе селезенки, уровень $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD20^+$ лимфоцитов селезенки по сравнению с интактными животными. При применении сухих экстрактов и «Иммунала» на фоне влияния метотрексата наблюдалось восстановление исследуемых показателей до значений, сопоставимых с интактной группой, что указывает на иммунокорректирующий эффект сухих экстрактов. Полученные данные позволяют рассматривать сухие экстракты клевера и цикория как перспективные растительные средства с иммуномодулирующим потенциалом, поскольку обладают антиоксидантными и иммуностропными свойствами, что подтверждается нормализацией показателей, характеризующих состав лимфоцитов селезенки животных, при воздействии иммуносупрессивного препарата. Действие экстрактов, сопоставимое с известным препаратом «Иммунал», указывает на возможность использования экстрактов в поддерживающей терапии при состояниях с нарушением иммунного ответа.

Ключевые слова: цикорий обыкновенный, клевер луговой, метотрексат, спленоциты, иммунная система, фенольные соединения, острая токсичность, Т- и В-лимфоциты

Для цитирования: Исследование сухих экстрактов клевера и цикория с оценкой их влияния на фенотип спленоцитов мышей при метотрексат-индуцированной иммуносупрессии / А. А. Синеговец, И. В. Михайлова, А. И. Смолягин, А. А. Черникова, Н. В. Винокурова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2026. Т. 17, вып. 1. С. 102–111. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-1-102-111>.

IMMUNOLOGY

Original article

Study of dry clover and chicory extracts with their effect on mouse splenocyte phenotype under methotrexate-induced immunosuppression

А. А. Sinegovets¹, I. V. Mikhailova¹, A. I. Smolyagin¹, A. A. Chernikova¹,
N. V. Vinokurova¹

¹ Orenburg state medical university of the Ministry of Health, Orenburg, Russia

Corresponding author: Angelina A. Sinegovets, a.a.sinegovets@yandex.ru

Abstract. The study of the quantitative content of phenolic compounds and the expression of antioxidant activity of the studied dry extracts showed that the level of phenolic compounds in the clover extract in terms of rutin was $6.50 \pm 0.01\%$, the expression of antioxidant activity was $47.64 \pm 2.15\%$, in the chicory extract the accumulation of phenolic compounds in terms of chicoric acid was $8.24 \pm 0.01\%$, and the expression of antioxidant activity was $62.67 \pm 1.85\%$. It was determined that dry extracts of clover and chicory do not have pronounced toxicity and are class 5 substances in accordance with GOST 32644-2014, and can be used in further research. A study of the effect of dry extracts on mouse and spleen weight, splenocyte count, splenic index, splenocyte-to-weight/spleen ratio, and splenocyte phenotype demonstrated that administration of the extracts did not cause statistically significant deviations from the intact group and the group of mice receiving the reference drug Immunol. Methotrexate, however, exerted a significant immunosuppressive effect, reducing mouse and spleen weight, splenocyte count, splenocyte-to-weight/spleen ratio, and splenic CD3+, CD4+, CD8+, and CD20+ lymphocyte levels compared to intact animals. Administration of dry extracts and Immunol, combined with methotrexate, resulted in a restoration of the studied parameters to values comparable to those in the intact group, indicating the immunocorrective effect of the dry extracts. The obtained data allow dry extracts of clover and chicory to be considered promising herbal remedies with immunomodulatory potential, as they possess antioxidant and immunotropic properties, as evidenced by the normalization of parameters characterizing the composition of splenic lymphocytes in animals exposed to an immunosuppressant. The effects of the extracts, comparable to those of the well-known drug «Immunol», suggest their potential use in supportive therapy for conditions with impaired immune response.

Keywords: common chicory, meadow clover, methotrexate, splenocytes, immune system, phenolic compounds, acute toxicity, T- and B-lymphocytes

For citation: Sinegovets A. A., Mikhailova I. V., Smolyagin A. I., Chernikova A. A., Vinokurova N. V. [Study of dry clover and chicory extracts with their effect on mouse splenocyte phenotype under methotrexate-induced immunosuppression]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Vol. 17, iss. 1 (2026): pp. 102-111. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-1-102-111>.

Введение

Современная биомедицина уделяет особое внимание изучению механизмов регуляции иммунной системы и поиску средств, способных поддерживать ее функциональную активность, нарушаемую как при хронических заболеваниях, так и в результате воздействия фармакологических агентов с цитостатическим эффектом. Метотрексат (МТХ), широко применяемый в терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний, несмотря на высокую клиническую эффективность, вызывает выраженное угнетение иммунного ответа [Cronstein, 2005]. Иммуносупрессивное действие МТХ проявляется снижением пролиферативной активности лимфоцитов, нарушением дифференцировки Т- и В-клеток, уменьшением числа зрелых В-клеток в селезенке и лимфоидных органах, а также нарушением продукции антител, что делает необходимым поиск средств, способных компенсировать эти неблагоприятные эффекты и поддерживать гомеостаз иммунной системы [Железнова, 2010]. Иммунный статус организма определяется функциональной интеграцией Т- и В-лимфоцитарных популяций, экспрессия специфических мембранных маркеров которых позволяет количественно и качественно оценивать состояние иммунной системы. Маркеры Т-клеточного звена CD3+, CD4+ и CD8+ отражают общий пул Т-лимфоцитов, субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток соответственно, участвуя в регуляции клеточного иммунного ответа и координации взаимодействия с другими компонентами иммунной системы. Мембранный белок CD20+, локализованный на зрелых В-лимфоцитах, играет ключевую роль в регуляции их активации, пролиферации и дифференцировки, а также обеспечивает эффективность формирования антительного ответа в В-клеточных зонах селезенки и лимфоузлов [Menees et al., 2021]. Изучение факторов, способных модулировать экспрессию CD3+, CD4+, CD8+ и CD20+, является важной задачей как фундаментальной, так и прикладной иммунофармакологии. Среди исследуемых подходов особое внимание уделяется биологически активным веществам (БАВ) растительного происхождения. В частности, фенольные соединения, обладающие антиоксидантной (АОА) и противовоспалительной активностью, могут оказывать влияние на популяционный состав лимфоцитов и стимулировать продукцию антител [Middleton et al., 2000]. Также было показано, что на фоне иммуносупрессии сухие экстракты цикория и клевера способствовали восстановлению параметров врожденного (фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов) и адаптивного иммунитета (реакции антителообразования, гемагглютинации и гиперчувствительности замедленного типа), активации антиоксидантных ферментов и снижению уровня продуктов перекисного окисления липидов [Сайбель и др., 2020, Синеговец др., 2025].

Цель исследования – определение количественного содержания фенольных соединений, антиоксидантной активности, острой токсичности сухих экстрактов клевера и цикория с оценкой их влияния на фенотип спленоцитов при иммуносупрессии, вызванной метотрексатом.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись сухие экстракты травы клевера лугового (СЭКТ) [Патент РФ №2803502] и травы цикория обыкновенного (СЭЦТ) [Патент РФ №2828665], полученные методом перколяции с использованием этилового спирта.

Определение количественного содержания фенольных соединений в СЭКТ в пересчете на рутин и в СЭЦТ в пересчете на цикориевую кислоту осуществляли методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре УФ-1200 («Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd», Китай) [ГФ РФ XV]. Об АОА экстрактов судили по способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода. Измерение проводили на спектрофотометре УФ-1200 («Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd», Китай) по отношению к раствору адреналина гидрохлорида с расчетом АОА в процентах. Величина более 10% свидетельствует о наличии АОА [Рябинина и др., 2011].

Определение острой пероральной токсичности проводили на 15 крысах-самках линии Wistar массой 180–220 г [ГОСТ 32644-2014; OECD Test No. 423:2001]. Животные получали перорально через желудочный зонд однократно водные растворы сухих экстрактов из расчета 5, 50, 300, 2000 мг/кг. При изучении острой пероральной токсичности клиническое наблюдение за каждым животным проводили после введения препарата ежедневно в течение последующих 14 дней. Фиксировали и отражали в первичной документации массу и выживаемость животных [ГОСТ 32644-2014; OECD Test No. 423:2001; Бибик и др., 2019].

Оценку влияние сухих экстрактов на иммунологические показатели проводили на беспородных мышьях-самках массой 18–22 г. Экспериментальная апробация и протокол исследования одобрен Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России (протокол № 342 от 20.09.2024). Иммуносупрессию вызывали препаратом «Метотрексат» («Эбеве-Фарма», Австрия, лекарственная форма – раствор для внутривенного и внутримышечного введения во флаконах) путем однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг [Железнова, 2010]. Полученные сухие экстракты вводили животным в виде водного раствора. По результатам экспериментальных исследований зависимости «доза – эффект» с использованием доз от 50 до 400 мг/кг была установлена экспериментально-терапевтическая доза 50 мг/кг путем перорального введения 1 раз в сутки на протяжении 3 дней [Михайлова и др., 2023, 2024]. Для сравнения был выбран препарат «Иммунал» (на основе экстракта эхинацеи пурпурной, «Sandoz», Словения), который вводили животным перорально 1 раз в сутки в виде водного раствора в дозе 240 мг/кг в течение 3 дней. Выбор референтного препарата обоснован его клинически подтвержденной эффективностью, широким применением в медицинской практике и особенностями фармакологического действия, реализующегося за счет содержания фенольных соединений, как и в исследуемых экстрактах [Морозов, 2009, Сайбель и др., 2020]. В интактную группу были включены мыши того же возраста, массы и пола, которые получали воду очищенную в соответствующем объеме по аналогичной схеме. Экспериментальные животные были разделены в соответствии с получаемыми веществами на следующие группы: 1-интактная (ИИТ), 2-иммунал 240 мг/кг (ИММ), 3- СЭЦТ 50 мг/кг, 4- СЭКТ 50 мг/кг, 5-MTX 10 мг/кг, 6-MTX 10 мг/кг+ ИММ 240 мг/кг, 7-MTX 10 мг/кг +СЭЦТ 50 мг/кг, 8-MTX 10 мг/кг +СЭКТ 50 мг/кг.

Массу животных и селезенки определяли на лабораторных весах («Масса-К» ВК-3000, Россия), после гомогенизации селезенки в камере Горяева определяли общее количество спленоцитов в органе. Селезеночный индекс рассчитывали как отношение массы селезенки (мг) к массе животного (г), также определяли отношения количества спленоцитов к массе животного и числа спленоцитов к массе селезенки [Волчегорский и др., 2000].

Для определения влияния на иммунофенотипирование спленоцитов выделенные селезенки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч. После проведения стандартной проводки и заливки в парафин были изготовлены срезы на ротационном микротоме «Leica» RM2125 RTS («Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd», Австралия). Для оценки иммунного статуса животных были применены моноклональные антитела к антигенным маркерам CD3 (клон G4,18, «Elabscience» Китай), CD4 (клон ОХ-38, «Elabscience» Китай), CD8 (клон ОХ-8, «Elabscience» Китай) и поликлональное CD20 («Elabscience» Китай) в разведении 1:500. Процедура окрашивания проводилась согласно протоколу производителя с помощью системы окрашивания «BOND-MAX» («Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd», Австралия). Система визуализации включала DAB с гематоксилином. Для отрицательного контроля первичные антитела были заменены фосфатно-солевым буфером. Окрашенные гистологические срезы оцифровывали с помощью цельнопредметного сканера слайдов «Aperio CS2» («Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd», Австралия) с использованием объектива 20x. Количественный анализ оцифрованных изображений проводили с использованием программного обеспечения для цифровой патологии QuPath (версия 0.3.2). Вручную размечали регионы интереса для последовательного анализа: периартериоллярные лимфоидные муфты (ПАЛМ), В-клеточные фолликулы. Для каждого маркера запускали встроенный алгоритм «Positive Cell Detection». Параметры детекции калибровали вручную для каждого антитела с учетом специфики окрашивания (ядерное, цитоплазматическое, мембранное). Результаты автоматической детекции в обязательном порядке верифицировали визуально. Были экспортированы следующие количественные параметры: площадь фолликулов, площадь ПАЛМ, плотность положительных клеток (на мм²) для каждого маркера.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ГФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Нормальность распределения признака определяли с помощью W-теста Шапиро – Уилка. При нормальном распределении для оценки различий показателей использовали критерий Стьюдента, для ненормально распределенных параметров использовали тест Манна – Уитни с расчетом медианы и квартилей (Me [Q₁; Q₃]). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0.05.

Результаты и их обсуждение

Исследование количественного содержания фенольных соединений и выраженности АОА изучаемых сухих экстрактов показало, что уровень фенольных соединений в сухом экстракте клевера лугового в пересчете на рутин составил 6.50±0.01%, выраженность АОА – 47.64±2.15%, в сухом экстракте цикория обыкновенного накопление фенольных соединений в пересчете на цикориювую кислоту составила 8.24±0.01%, а выраженность АОА – 62.67±1.85%, что свидетельствует о значительном проявлении антиоксидантных свойств исследуемых экстрактов [Рябинина и др., 2011].

О токсическом действии экстрактов судили по изменению массы животных и их выживаемости. За 14-дневный период наблюдения после перорального введения сухих экстрактов травы клевера лугового и травы цикория обыкновенного не было зафиксировано ни одного случая гибели мышей ни на одной из указанных дозировок, а также не отмечено статистически значимого изменения массы тела, в связи с чем полученные результаты позволяют констатировать, что сухие экстракты цикория обыкновенного и клевера лугового относятся к малотоксичным веществам, что соответствует 5 классу токсичности (LD50≥5000 мг/кг) [ГОСТ 32644-2014; OECD Test No. 423:2001], и могут применяться в дальнейших исследованиях.

Анализ полученных результатов влияния исследуемых сухих экстрактов на показатели массы мышей и количество спленоцитов установил, что по сравнению с интактной группой мышей сухие экстракты клевера и цикория, а также «Иммунал» в подавляющем большинстве результатов не изменяли массу мышей и селезенки, число спленоцитов, а также селезеночный индекс и отношение количества спленоцитов к массе животного и массе селезенки (табл. 1).

Таблица 1

Влияние сухих экстрактов на показатели массы мышей и количество спленоцитов при метотрексат-индуцированной иммуносупрессии (Me [Q₁; Q₃])

[Effect of dry extracts on mouse weight and splenocyte count in methotrexate-induced immunosuppression]

Группа	Масса мыши, г	Масса селезенки, мг	Число спленоцитов, x10 ⁶ /орган	Селезеночный индекс, мг/г	Число спленоцитов/масса тела, x10 ⁶ /г	Число спленоцитов/масса селезенки, x10 ⁶ /мг
ИНТ n=8	26 [26; 28]	135 [124; 141]	155 [150; 159]	4.75 [4.49; 5.21]	5.77 [5.17; 6.08]	1.12 [1.09; 1.17]
ИММ n=8	28 [27; 30]	132 [123; 138]	145 [131; 154]	4.62 [4.35; 5.09]	5.13 [4.82; 5.43]	1.11 [1.08; 1.13]
СЭЦГ n=8	28 [28; 29]	130 [122; 134]	163# [154; 172]	4.64 [4.32; 4.84]	5.76# [5.50; 6.19]	1.27# [1.19; 1.40]
СЭКГ n=8	25 [23; 34]	137 [135; 138]	146 [142; 151]	5.53 [4.08; 5.82]	5.91 [4.25; 6.31]	1.14 [1.12; 1.16]
МТХ n=8	24*# [23; 24]	111*# [98; 112]	112*# [107; 114]	4.53 [4.35; 4.64]	4.71* [4.58; 4.84]	1.03*# [1.02; 1.06]
МТХ+ИММ n=8	27▲ [26; 27]	128▲ [125; 131]	150▲ [145; 156]	4.83 [4.38; 5.28]	5.74▲ [5.42; 6.43]	1.19▲ [1.15; 1.23]
МТХ+СЭЦГ n=8	29▲ [26; 31]	135▲ [125; 138]	143▲ [140; 156]	4.68 [4.42; 4.90]	5.02 [4.75; 5.48]	1.04 [1.03; 1.25]
МТХ+СЭКГ n=8	27▲ [26; 28]	130▲ [119; 140]	151▲ [144; 171]	4.61 [4.25; 5.18]	5.71▲ [5.09; 6.73]	1.23▲ [1.16; 1.35]

Примечание: здесь и далее различия параметров статистически значимы при p ≤ 0.05: * – по сравнению с животными 1 группы; # – по сравнению с животными 2 группы; ▲ – по сравнению с животными 5 группы.

Результаты, полученные при введении животным МТХ, напротив, указывали на статистически значимое снижение массы мышей и селезенки, числа спленоцитов, совместно с отношением количества спленоцитов к массе животного и массе селезенки. В случае введения сухих экстрактов клевера, цикория, а также препарата сравнения на фоне влияния цитостатика, отмечалось статистически значимое изменение параметров, заключающееся в восстановлении до уровня интактных животных: массы мышей и

массы селезенки, числа спленцитов, отношения количества спленцитов к массе животного и массе селезенки, что говорит о наличии иммуотропных свойств, изучаемых фитосубстанций (табл. 1).

Исследование фенотипа спленцитов установило, что в интактной группе животных показатели морфофункционального состояния селезенки соответствовали норме [Кузнецов и др., 2002]. Т-клеточная зона (ПАЛМ) имела сохраненную архитектуру и достаточную плотность CD3⁺ лимфоцитов. Также отмечалось сбалансированное распределение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ клеток. В-клеточные зоны характеризовались хорошо выраженными фолликулами с четкой структурной организацией и высокой клеточностью (табл. 2). Эти данные послужили ориентиром для последующего анализа изменений под воздействием исследуемых препаратов.

Таблица 2

Влияние сухих экстрактов на фенотип спленцитов мышей при метотрексат-индуцированной иммуносупрессии (Me [Q₁; Q₃])

[Effect of dry extracts on the phenotype of mouse splenocytes in methotrexate-induced immunosuppression]

Группа	CD3 ⁺ , ед./1мм ²	CD4 ⁺ , ед./1мм ²	CD8 ⁺ , ед./1мм ²	Площадь ПАЛМ, мкм ²	CD20 ⁺ , ед./1мм ²	Площадь фолликула, мкм ²
ИНТ n=8	4482 [4194; 4789]	3834 [3300; 4942]	3782 [3519; 4478]	128930 [97921; 135552]	160300 [15613; 16474]	80835 [75948; 83855]
ИММ n=8	4077 [3905; 4381]	3777 [3345; 4386]	4000 [3820; 4496]	100260 [92438; 101663]	16400 [15949; 16791]	71550 [67187; 82862]
СЭЦТ n=8	4355 [4025; 4682]	4029 [3901; 4428]	3512 [3265; 4049]	74067 [73332; 81404]	15959 [15508; 16373]	79756 [72012; 87526]
СЭКТ n=8	4589 [4435; 4697]	4162 [3954; 4397]	3329# [3107; 3478]	85044# [78117; 91852]	15732 [15396; 15828]	82655 [77359; 89324]
МТХ n=8	3218*# [2456; 3375]	2832*# [2548; 3291]	1962*# [1926; 2117]	50051# [45040; 54296]	13675*# [13408; 14009]	71901* [69385; 73847]
МТХ+ ИММ n=8	4403▲ [4312; 4558]	3806▲ [3572; 4050]	3833▲ [3714; 3900]	79199▲ [59526; 84101]	15346▲ [15254; 15668]	75017 [72215; 76698]
МТХ+ СЭЦТ n=8	4155▲ [3924; 4417]	3772▲ [3532; 3952]	3446▲# [3066; 3773]	66944▲ [65140; 69588]	15584▲ [15169; 15979]	75381 [74521; 76703]
МТХ+ СЭКТ n=8	4400▲ [4238; 4730]	4048▲ [3848; 4188]	3221▲# [3101; 3651]	75016▲ [72824; 76607]	15351▲ [15313; 15646]	74687 [73790; 76664]

В группах животных, получавших ИММ, СЭЦТ и СЭКТ показатели, характеризующие Т-зону (экспрессия CD3⁺, а также распределение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ клеток), находились в пределах значений интактной группы, что указывает на отсутствие иммуносупрессивного эффекта данных экстрактов (рис. 1–3). Экспрессия CD20⁺ в В-клеточной зоне сохранялась на уровне интактной группы, площадь В-фолликулов также не демонстрировала выраженных отклонений, подтверждая стабильность структурной организации селезенки (рис. 4). На рисунках 1–4 цифрами обозначены: 1 – центральная артериола, 2 – белая пульпа, 3 – красная пульпа, 4 – фолликул, 5 – ПАЛМ, 6 – CD-клетки.

В группе животных, получавших МТХ, наблюдалось статистически значимое снижение количества CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ клеток, а также экспрессии CD20⁺ и площади фолликулов, что свидетельствует об иммуносупрессивном действии данного препарата. В группе животных, получавших «Иммунал» на фоне МТХ, показатели количества CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ оказались статистически значимо выше, чем у животных, получавших МТХ, что свидетельствует об иммунокорректирующем действии препарата. У животных, получавших СЭЦТ на фоне МТХ, отмечалось заметное улучшение иммунологических показателей по сравнению с группой МТХ, что выражалось в увеличении количества CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺, а также площади ПАЛМ. Введение СЭКТ в условиях метотрексат-индуцированной иммуносупрессии также сопровождалось положительной динамикой большинства показателей: количество клеток CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺, CD20⁺, площадь ПАЛМ по сравнению с МТХ, при этом значения приближались к уровню интактных животных (табл. 2).

Необходимо отметить, что МТХ оказывал выраженное угнетающее действие на экспрессию CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺, что согласуется с литературными данными о его способности индуцировать супрессию иммунного ответа за счет нарушения пролиферации и дифференцировки лимфоцитов [Saeed et al., 2024].

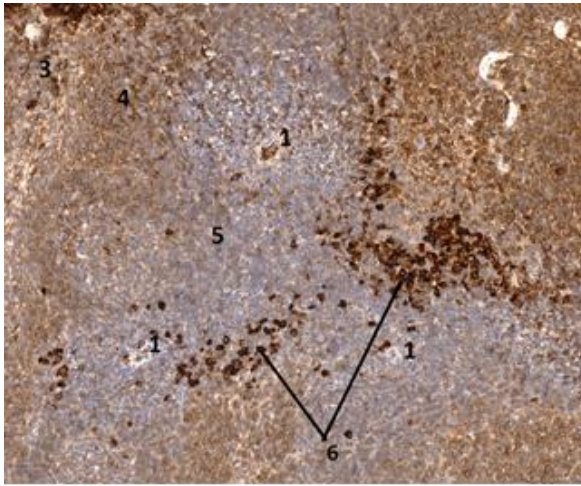


Рис. 1. Селезенка мыши, группа ИММ. ИГХ окрашивание на маркер CD3.
Масштабная линейка: 100 мкм
[Mouse spleen, IMM group. IHC staining for the CD3 marker. Scale bar, 100 μ m]

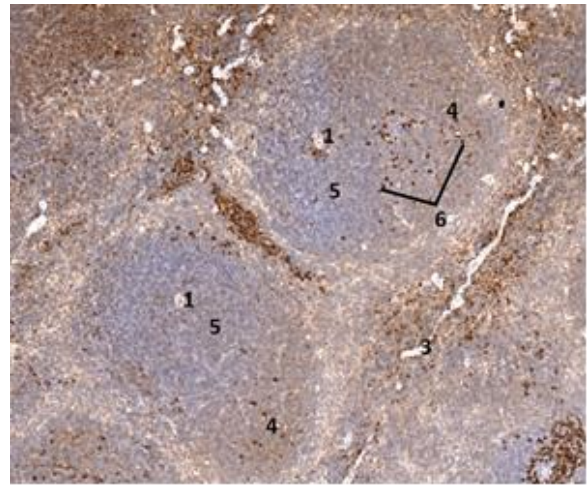


Рис. 2. Селезенка мыши, группа СЭКТ. ИГХ окрашивание на маркер CD8.
Масштабная линейка: 100 мкм
[Mouse spleen, SECT group. IHC staining for the CD8 marker. Scale bar: 100 μ m]

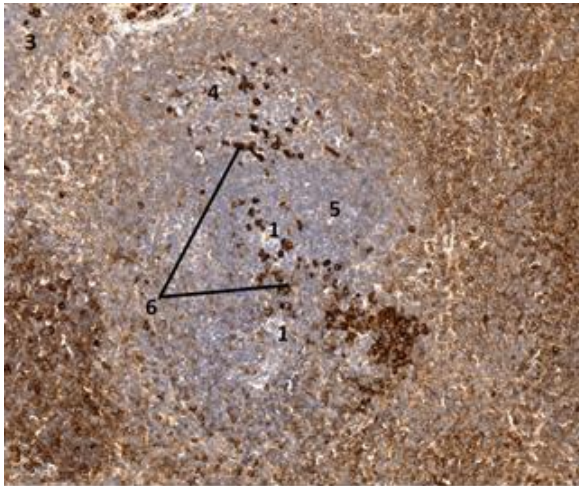


Рис. 3. Селезенка мыши, группа СЭКТ. ИГХ окрашивание на маркер CD4.
Масштабная линейка: 100 мкм
[Mouse spleen, SECT group. IHC staining for the CD4 marker. Scale bar, 100 μ m]

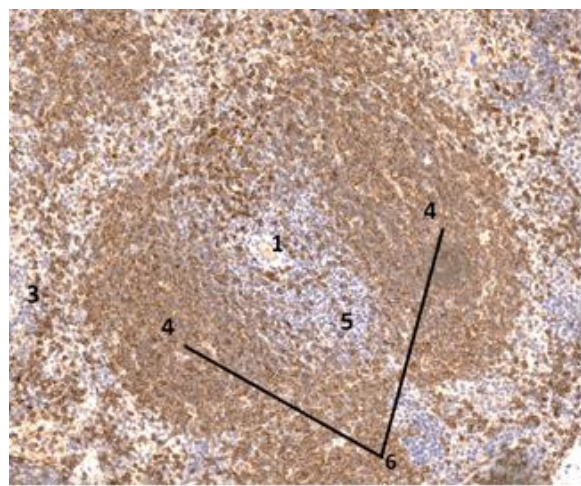


Рис. 4. Селезенка мыши, группа ИММ. ИГХ окрашивание на маркер CD20.
Масштабная линейка: 100 мкм
[Mouse spleen, IMM group. IHC staining for the CD20 marker. Scale bar, 100 μ m]

Полученные результаты свидетельствовали о снижении количества клеток в Т- и В-зависимых зонах селезенки и уменьшении их морфометрических характеристик, что отражает структурно-функциональные изменения в иммунной системе при цитостатической терапии. В то же время введение сухих экстрактов клевера и цикория также, как и «Иммунала», способствовало нормализации исследуемых показателей, что может быть объяснено наличием в их составе фенольных соединений, обладающих антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами [Ferreira et al., 2024]. Выраженность антиоксидантных свойств исследуемых экстрактов, вероятно, объясняется высоким содержанием фенольных соединений, механизм действия которых основан на способности предотвращать повреждающее действие свободных радикалов путем нейтрализации активных форм кислорода и обрыва цепных свободно-радикальных реакций, тем самым снижая уровень оксидативного стресса и повреждения иммунных клеток [Ноорег et al., 2008].

Полученные данные показывают, что растительные экстракты при совместном введении с МТХ способствуют нормализации иммунологических параметров, что свидетельствует об их иммунокорректирующем действии. Наблюдаемое восстановление численности Т- и В-лимфоцитов согласуется с современными представлениями о механизмах действия фенольных соединений, которые способны оказывать

антиоксидантное и противовоспалительное воздействие, регулируя баланс цитокинов и снижая уровень оксидативного стресса [Pavlasova, Mraz, 2020].

Фенольные соединения, содержащиеся в исследуемых экстрактах, оказывают прямое влияние на внутриклеточные сигнальные пути, такие как NF- κ B и MAPK, что способствует активации Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, а также поддерживает функциональную активность В-лимфоцитов [Yahfoufi et al., 2018]. Кроме того, показано, что полифенолы способны усиливать антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток, что косвенно приводит к увеличению экспрессии CD3⁺ и CD4⁺ клеток, а также стимулирует продукцию антител за счет активации CD20⁺ В-лимфоцитов [Wang et al., 2022].

Таким образом, сопоставление полученных результатов с данными литературы указывает на то, что фитопрепараты, богатые фенольными соединениями, способны нивелировать последствия цитостатически индуцированной иммуносупрессии, что позволяет рассматривать сухие экстракты клевера и цикория как перспективные кандидаты для дальнейших доклинических и клинических исследований в целях разработки средств вспомогательной терапии при иммуносупрессивных состояниях.

Заключение

Современные исследования подтверждают значимость цитостатически индуцированной иммуносупрессии как одной из ключевых проблем клинической фармакологии, ограничивающей терапевтический потенциал использования метотрексата. Известно, что фенольные соединения растительного происхождения рассматриваются как перспективные иммуномодуляторы, обладающие антиоксидантными, противовоспалительными и иммунотропными свойствами. Тем не менее, остаётся нерешённым вопрос их влияния на состав лимфоцитов селезенки, в частности на субпопуляции клеток CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺ в условиях лекарственно индуцированной супрессии.

Результаты проведенного исследования показали, что сухие экстракты травы клевера и цикория, обладающие высоким содержанием фенольных соединений и антиоксидантной активностью, при введении на фоне метотрексата способствуют восстановлению массы животных и селезенки, количества спленоцитов, количества клеток Т- и В-зон селезенки, нормализации площади лимфоидных фолликулов и ПАЛМ, а также повышению плотности CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD20⁺ клеток до уровня интактных животных и группы сравнения, получавших «Иммунал». Полученные данные свидетельствуют о наличии иммунокорректирующего потенциала у исследуемых экстрактов, проявляющемся в коррекции нарушений исследуемых показателей иммунитета. Такой эффект может быть обусловлен комплексным действием фенольных соединений, которые участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, а также в восстановлении баланса между субпопуляциями иммунных клеток.

Научная значимость результатов заключается в расширении представлений о механизмах иммунотропного действия фенольных соединений, а практическая – в возможности использования сухих экстрактов клевера лугового и цикория обыкновенного в качестве потенциальных адьювантных средств для коррекции иммунодефицитных состояний, возникающих на фоне цитостатической терапии.

Список источников

1. Бибик И.В. и др. Определение острой пероральной токсичности отдельных производных тетрагидропиридонов и гексагидрохинолинов, производных α -цианотиоацетамида // Человек и его здоровье. 2019. № 4. С. 96–103. DOI: 10.21626/vestnik/2019-4/12. EDN: ZORXZM.
2. Волчегорский И.А. и др. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во ЧГПУ, 2000. 167 с. EDN: MLPRZJ.
3. ГОСТ 32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности. М.: Стандартинформ, 2014. 15 с. URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293767/4293767037.pdf> (дата обращения: 10.10.2025).
4. ГФ РФ XV – Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. Федеральная электронная медицинская библиотека, 2024. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (дата обращения: 10.10.2025).
5. Железнова А.Д. Экспериментальное обоснование применения милиацина для коррекции иммуносупрессии, индуцированной метотрексатом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пермь, 2010. 22 с. URL: <https://www.dissercat.com/content/eksperimentalnoe-obosnovanie-primeneniya-miliatsina-dlya-korreksii-immunosupressiiindutsiro> (дата обращения: 10.10.2025). EDN: UNINYL.
6. Михайлова И.В. и др. Оценка иммунорегуляторных свойств сухого экстракта травы *Cichorium intybus* L. в системах *in vitro* и *in vivo* // Цитокины и воспаление. 2023 Т. 20, № 1 С. 25–31. DOI: 10.17816/CJ2023231-4. EDN: HXJSZM. URL: <https://cijournal.ru/1684-7849/article/view/623749> (дата обращения: 21.12.2025).

7. Михайлова И.В. и др. Оценка иммуномодулирующего действия сухого экстракта травы *Trifolium pratense* L. // Вестник Биомедицина и Социология. 2024. Т. 9, № 2 С. 44–51. DOI: 10.26787/nydha-2618-8783-2024-9-2-44-51. EDN: ONVPRG.
8. Морозов С.Ю. О применении препарата «Иммунал» в терапевтической практике // Русский медицинский журнал. 2009. № 14. С. 928–930. EDN: PCEJUI.
9. Патент № 2828665 Российская Федерация, МПК А61К 36/48 А61Р 37/02 А61Р 39/06 В01Д 11/02. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью, на основе травы *Trifolium pratense* 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. EDN: WXOJFJ.
10. Патент № 2803502 Российская Федерация, МПК А61К 36/28, А61Р 37/02, А61Р 39/06, В01Д 11/02. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью. № 2022131332; заявл. 29.11.2022 : опубл. 14.09.2023 / 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.; заявитель ФГБОУ ВО «ОрГМУ» Минздрава РФ. 10 с. : ил. EDN: JUCAXW.
11. Рябинина Е.И. и др. Новый подход к оценке антиоксидантной активности растительного сырья при изучении процесса автоокисления адреналина // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 117–121. EDN: OHSUOV.
12. Сайбель О.Л. и др. Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. Т. 10, № 4. С. 36–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45. EDN: VQONFS.
13. Синеговец А.А. и др. Исследование иммуностропных свойств сухих экстрактов клевера и цикория на фоне иммуносупрессии // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2025. Вып. 3. С. 313–321. DOI: 10.17072/1994-9952-2025-3-313-321. EDN: QIIGXJ.
14. Cronstein B.N. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis // *Pharmacological Reviews*. 2005. Vol. 57, № 2. P. 163–172. DOI: 10.1124/pr.57.2.3.
15. Ferreira C. et al. Polyphenols: immunonutrients tipping the balance of immunometabolism in chronic diseases // *Frontiers in Immunology*. 2024. Vol. 15. Art. 1360065. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1360065> (дата обращения 10.10.2025). DOI: 10.3389/fimmu.2024.1360065. EDN: RACGDH.
16. Hooper L. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials // *Am. J. Clin. Nutr.* 2008. Vol. 88. P. 38–50. URL: <https://www.sci-hub.ru/10.1093/ajcn/88.1.38> (дата обращения: 10.10.2025).
17. Menees K.B. et al. Sex- and age-dependent alterations of splenic immune cell profile and NK cell phenotypes and function in C57BL/6J mice // *Immun Ageing*. 2021. Vol. 18, № 1. Art. 3. DOI: 10.1186/S12979-021-00214-3. EDN: UBSFCN.
18. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer // *Pharmacological Reviews*. 2000. Vol. 52, № 4. P. 673–751.
19. OECD Test No. 423:2001. Methods of testing the effects of chemical products on the human body. Acute oral toxicity — method for determining the class of acute toxicity / Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Paris: OECD Publ., 2002. 14 p. URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method.pdf> (дата обращения: 10.10.2025).
20. Pavlasova G., Mraz M. The regulation and function of CD20: an «enigma» of B-cell biology and targeted therapy // *Haematologica*. 2020. Vol. 105, № 6. P. 1494–1506. DOI: 10.3324/haematol.2019.243543. EDN: FTMEUR.
21. Saeed M. et al. Polyphenols as immunomodulators and epigenetic modulators in health and disease // *Nutrients*. 2024. Vol. 16(23). Art. 4143. DOI: 10.3390/nu16234143. EDN: AAQZON.
22. Wang Q. et al. Tumor immunomodulatory effects of polyphenols // *Frontiers in Immunology*. 2022. Vol. 13. Art. 1041138. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/> (дата обращения: 10.10.2025). DOI: 10.3389/fimmu.2022.1041138. EDN: JIIBJZ.
23. Yahfoufi N. et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols // *Nutrients*. 2018. Vol. 10, № 11. Art. 1618. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1618> (дата обращения: 10.10.2025).

References

1. Bibik I.V., Korokin M.V., Krivokolysko S.G., Bibik E.Y., Frolov K.A., Dotsenko V.V. [Determination of acute oral toxicity of individual derivatives of tetrahydropyridones and hexahydroquinolines, derivatives of α -cyanothioacetamide]. *Čelovek i ego zdorov'je*. No. 4 (2019): pp. 96–103. (In Russ.). DOI: 10.21626/vestnik/2019-4/12. EDN: ZORXZM.

2. Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.E. *Èksperimental'noe modelirovanie i laboratornaja ocenka adaptivnykh reakcij organizma* [Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism]. Chelyabinsk, ChGPU Publ., 2000. 167 p. (In Russ.). EDN: MLPRZJ.
3. GOST 32644-2014. *Metody` ispytaniya po vozdejstvu chimičeskoj produkcii na organizm čeloveka. Ostraja peroral'naja toksičnost` - metod opredelenija klassa ostroj toksičnosti* [GOST 32644-2014. Methods for testing the effects of chemical products on the human body. Acute oral toxicity - method for determining the class of acute toxicity]. Moscow, Standartinform Publ., 2014. 15 p. (In Russ.). Available at: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293767/4293767037.pdf> (accessed 10.10.2025).
4. *GF RF XV - Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XV edition]. Federal Electronic Medical Library, 2024. (In Russ.). Available at: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> (accessed 10.10.2025).
5. Zheleznova A.D. *Èksperimental'noe obosnovanie primeneniya miliacina dlja korrëkcii immunosupressii, inducirovannoj metotreksatom. Avtoref. dis. kand. med. nauk* [Experimental substantiation of the use of miliacin for the correction of methotrexate-induced immunosuppression. Avtoref. Kand. dis.]. Perm, 2010. 22 p. (In Russ.). Available at: <https://www.dissercat.com/content/eksperimentalnoe-obosnovanie-primeneniya-miliatsina-dlya-korrëkcii-immunosupressiiindutsiro> (accessed 10.10.2025).
6. Mikhaylova I.V., Ivanova E.V., Smolyagin A.I., Bondarenko A.I., Sinegovets A.A., Bondarenko T.A., Bekpergenova A.V. [Evaluation of immunoregulatory properties of dry extract of Cichorium intybus L. herb in vitro and in vivo systems]. *Citokiny i vospalenie*. V. 20, No. 1 (2023): pp. 25-31. (In Russ.). DOI: 10.17816/CI2023231-4. EDN: HXJSZM. Available at: <https://cijournal.ru/1684-7849/article/view/623749> (accessed 21.12.2025).
7. Mikhaylova I.V., Sinegovets A.A., Smolyagin A.I., Kuzmicheva N.A., Pavlenko M.A. [Evaluation of immunomodulatory effect of dry extract of Trifolium pratense L. herb]. *Vestnik Biomedicina i Sociologija*. V. 9, No. 2 (2024): pp. 44-51. (In Russ.). DOI: 10.26787/nydha-2618-8783-2024-9-2-44-51. EDN: ONVPRG.
8. Morozov S.Yu. [On the Use of "Immunal" in Therapeutic Practice]. *Russkij medicinskij žurnal*. No. 14 (2009): pp. 928-930. (In Russ.). EDN: PCEJUI.
9. Patent RU № 2828665. *Sposob polučeniya sredstva, obladajuščego antioksidantnoj i immunomodulirujuščej aktivnost'ju, na osnove travy Trifolium pratense L.* [Method for obtaining a remedy with antioxidant and immunomodulatory activity based on Trifolium pratense L. herb]. No. 2023131553; appl. 28.11.2023; publ. 15.10.2024 / Mikhaylova I.V., Ivanova E.V., Sinegovets A.A., Smolyagin A.I., Kuzmicheva N.A.; applicant FSBEI HE "OrSMU" Ministry of Health of the Russian Federation. 9 p.: ill. (In Russ.). EDN: WXOJFJ.
10. Patent RU № 2803502. *Sposob polučeniya sredstva, obladajuščego antioksidantnoj i immunomodulirujuščej aktivnost'ju* [Method for obtaining a remedy with antioxidant and immunomodulatory activity]. No. 2022131332; appl. 29.11.2022; publ. 14.09.2023 / Mikhaylova 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.; applicant FSBEI HE "OrSMU" Ministry of Health of the Russian Federation. 10 p.: ill. (In Russ.). EDN: JUCAXW.
11. Ryabinina E.I., Zotova E.E., Vetrova E.N., Ponomareva N.A., Ilyushina T.N. [A new approach to assessing the antioxidant activity of plant raw materials in the study of adrenaline autooxidation]. *Chimija rastitel'nogo syr'ja*. No. 3 (2011): pp.117-121. (In Russ.). EDN: OHSUOV.
12. Saybel' O.L., Radimich A.I., Dargaeva T.D., Lupanova I.A., Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Martynchik I.A. [Phenolic compounds and pharmacological screening of the extract of Cichorium intybus L. herb]. *Razrobotka i registracija lekarstvennykh sredstv*. V. 10, No. 4 (2021): pp. 36-45. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45. EDN: VQONFS.
13. Sinegovets A.A., Mikhailova I.V., Smolyagin A.I., Filippova Yu.V., Kuzmicheva N.A. [Study of immunotropic properties of dry extracts of clover and chicory against the background of immunosuppression]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 3 (2025): pp. 313-321. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2025-3-313-321. EDN: QIIGXJ.
14. Cronstein B.N. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reviews*. V. 57, No. 2 (2005): pp. 163-172. DOI: 10.1124/pr.57.2.3.
15. Ferreira C., Vieira P., Sa H., Malva J., Castelo-Branco M., Reis F., Viana S. Polyphenols: immunonutrients tipping the balance of immunometabolism in chronic diseases. *Frontiers in Immunology*. V. 15 (2024). Art. 1360065. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1360065> (accessed 10.10.2025).
16. Hooper L., Kron P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Le Cornu K.A. et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* V. 88 (2008): pp. 38-50. Available at: <https://www.sci-hub.ru/10.1093/ajcn/88.1.38> (accessed 10.10.2025).
17. Menees K.B. et al. Sex- and age-dependent alterations of splenic immune cell profile and NK cell phenotypes and function in C57BL/6J mice. *Immun Ageing*. V. 18, No. 1. (2021). Art. 3. DOI: 10.1186/S12979-021-00214-3. EDN: UBSFCN.

18. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. V. 52, No. 4 (2000): pp. 673-751.

19. OECD Test No. 423:2001. Methods of testing the effects of chemical products on the human body. Acute oral toxicity — method for determining the class of acute toxicity / Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Paris: OECD Publishing, 2002. 14 p. URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method.pdf> (дата обращения: 10.10.2025).

20. Pavlasova G., Mraz M. The regulation and function of CD20: an «enigma» of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*. 2020. V. 105, No. 6 (2020): pp. 1494-1506. DOI: 10.3324/haematol.2019.243543. EDN: FTMEUR.

21. Saeed M., Naveed M., Arif M., Kamboh A.A. Polyphenols as immunomodulators and epigenetic modulators in health and disease. *Nutrients*. V. 16(23) (2024). Art. 4143. DOI: 10.3390/nu16234143. EDN: AAQZON.

22. Wang Q., Yang B., Wang N., Gu J. Tumor immunomodulatory effects of polyphenols. *Frontiers in Immunology*. V. 13 (2022). Art. 1041138. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles> (accessed 10.10.2025). DOI: 10.3389/fimmu.2022.1041138. EDN: JIIBJZ.

23. Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M., Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. V. 10, No. 11 (2018). Art. 1618. Available at: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1618> (accessed 10.10.2025).

Статья поступила в редакцию 27.10.2025; одобрена после рецензирования 16.01.2026; принята к публикации 03.03.2026.

The article was submitted 27.10.2025; approved after reviewing 16.01.2026; accepted for publication 03.03.2026.

Информация об авторах

Ангелина Анатольевна Синеговец – a.a.sinegovets@yandex.ru, ассистент кафедры фармацевтической химии;
Ирина Валерьевна Михайлова – michaylova74@yandex.ru, д-р биол. наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтической химии;
Александр Иванович Смолягин – a.i.smolyagin@mail.ru, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной и функциональной диагностики;
Анастасия Анатольевна Черникова – ishtokkina@gmail.com, аспирант кафедры патологической анатомии;
Наталья Викторовна Винокурова – nschustova@mail.ru, канд. биол. наук, доцент кафедры фармацевтической химии.

Information about the authors

Angelina A. Sinegovets – a.a.sinegovets@yandex.ru, Assistant of the Department of Pharmaceutical Chemistry;
Irina V. Mikhailova – michaylova74@yandex.ru, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry;
Alexandr I. Smolyagin – a.i.smolyagin@mail.ru, Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Clinical Laboratory and Functional Diagnostics;
Anastasia A. Chernikova – ishtokkina@gmail.com, Postgraduate student of the Department of Pathological Anatomy;
Natalia V. Vinokurova – nschustova@mail.ru, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry.

Вклад авторов:

Синеговец А. А. – развитие методологии; получение и обработка результатов, написание исходного текста.
Михайлова И. В. – научное руководство; концепция исследования.
Смолягин А. И. – итоговые выводы.
Черникова А. А. – доработка текста.
Винокурова Н. В. – статистическая обработка материала.

Contribution of the authors:

Sinegovets A. A. – development of methodology; writing the original text.
Mikhailova I. V. – research supervision; research concept.
Smolyagin A. I. – final conclusions.
Chernikova A. A. – text revision.
Vinokurova N. V. – statistical processing of the material.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interests.