

*Генералова А. Г., Коротина О. Л., Моисеева А. М., Железняк Н. В.*

**ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА И ЭТАНОЛА  
НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ  
И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский  
университет, Беларусь*

Полифенол растительного происхождения ресвератрол (*trans*-3,4',-5-тригидроксистильбен) относится к фитоалексинам — растительным гормонам с эстрогеноподобным действием. Максимальное количество ресвератрола обнаружено в корнях горца гребенчатого (*Polygonum cuspidatum*), это растение широко применяется в традиционной японской и китайской медицине. Повышенное содержание ресвератрола отмечается в кожуре и косточках красных сортов винограда.

Среди многочисленных эффектов *ресвератрола* — нормализация клеточного обмена и усиление транспорта кислорода, регуляция жирового обмена в печени, укрепление сосудистой стенки и снижение ее проницаемости, улучшение реологических показателей крови, противоаллергическое, радиопротекторное, противовоспалительное, противораковое и сосудорасширяющее действие [1]. Ряд вышеописанных эффектов ресвератрола связан с подавлением синтеза провоспалительных цитокинов, регулируемых через фактор транскрипции NF- $\kappa$ B. Кроме того, ресвератрол ингибирует синтез эйкозаноидов, подавляет циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2) и в определенных условиях ЦОГ-1. Угнетает перекисное окисление липидов,

снижает агрегацию тромбоцитов. Препарат стимулирует апоптоз раковых клеток, однако подавляет апоптоз кардиомиоцитов при их ишемии [1, 2]. Также в литературе имеются указания на антибактериальную, противовирусную и антимикотическую активность ресвератрола. Ресвератрол способен ингибировать рост *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также пяти штаммов грибков-дерматофитов [2]. В концентрации 15 мг/мл ресвератрол прекращал ползучий рост *Proteus mirabilis*. Также он ингибировал рост 16 штаммов *Helicobacter pylori* в условиях *in vitro* [2]. В отдельных работах изучалось влияние ресвератрола на фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а также пролиферативную активность лимфоцитов [3, 4]. С учетом вышеизложенного, очевидный интерес представляет оценка действия ресвератрола и ресвератрол-содержащих растительных экстрактов на основные звенья клеточного и гуморального иммунитета.

Таким образом, **целью** настоящего исследования стала оценка влияния ресвератрола, ресвератрол-содержащих растительных экстрактов и стабилизатора ресвератрола (этанол) на ряд показателей, характеризующих состояние системы иммунитета человека: пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены, фагоцитоз микроорганизмов лейкоцитами.

#### **Материалы и методы**

Анализ ресвератрола проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent с использованием колонок Zorbax StableBond 5 мкм 250 × 4,6 мм с диодно-матричным детектированием. В качестве источника ресвератрола в экспериментах применяли препарат «Кардивитол» производства ГП «Академфарм», Республика Беларусь. По данным ВЭЖХ, препарат содержит ресвератрол > 95 % чистоты.

Ресвератрол-содержащие растительные экстракты получали из горца татарского обработкой 70 % этанолом в течение 1 ч при  $t = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В дальнейшем их фракционировали на обращенно-фазовых С8- или С16-матрицах с последующей ступенчатой элюцией водными растворами этанола.

Пролиферативную активность лимфоцитов определяли в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с митогенами. Для РБТЛ применяли В- и Т-клеточные митогены: бактериальный липополисахарид (ЛПС) *S. flexneri*, лектин фитогемагглютинин (ФГА) производства Gibco, США.

Оценку фагоцитоза проводили, устанавливая фагоцитарный индекс и фагоцитарное число лейкоцитов периферической крови, инкубированных 30 мин при  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  с инактивированной культурой *S. aureus* ATCC 6538.

Для постановки реакций использовали обогащенную лейкоцитами плазму здоровых добровольцев. Так как этанол может обладать собственным иммуносупрессивным действием, влияние ресвератрола и его растворителя (этанола) на клеточный иммунный ответ изучалось отдельно. После добавления в реакционную смесь для РБТЛ конечная концентрация ресвератрола в ней составила  $0,5 \times 10^{-5}$  М. Конечные концентрации этанола

в разных пробах РБТЛ составляли 0,01 %; 0,05 %; 0,2 % и 0,5 %. При оценке фагоцитоза конечная концентрация ресвератрола в среде была равной  $3,5 \times 10^{-5}$  М. Конечные концентрации этанола в разных разведениях составляли 0,05 %; 0,2 % и 0,5 % соответственно.

Учет РБТЛ производили прямым морфологическим методом при помощи микроскопа Leica DM 2000. Подсчитывали общее количество бластных клеток на 500 лимфоцитов. При микроскопическом методе определения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа подсчитывали общее количество лейкоцитов и лейкоцитов, содержащих микроорганизмы.

### **Результаты и обсуждение**

Анализ влияния ресвератрола, ресвератрол-содержащих извлечений и этанола в различных концентрациях на пролиферативную активность лимфоцитов и фагоцитарную активность лейкоцитов выявил, что оба соединения обладают ингибирующим действием в отношении этих звеньев системы иммунитета. В частности, этанол в дозозависимой манере подавлял бласттрансформацию лимфоцитов, индуцированную ФГА. В свою очередь, ресвератрол в концентрации  $0,5 \times 10^{-5}$  М обладал более выраженным антипролиферативным действием в отношении лимфоцитов, стимулированных ФГА, по сравнению с максимальной 0,5 % концентрацией этанола. Аналогичным образом ресвератрол практически полностью ингибировал бласттрансформацию лимфоцитов, стимулированную ЛПС, приближая уровень пролиферации к контрольным значениям без митогена. Извлечения, полученные из горца татарского при спиртовой экстракции и последующей обращенно-фазовой хроматографии, также угнетали бласттрансформацию лимфоцитов не менее чем в 2–2,5 раза в сравнении с митогенами, при этом образец, полученный при экстракции с С8-силикагеля, проявлял заметную цитотоксическую активность.

При анализе действия ресвератрола и этанола на фагоцитоз было установлено, что они способны снижать фагоцитарную активность лейкоцитов. Ингибирующий эффект этанола в концентрации 0,05 % был сопоставим с действием ресвератрола в концентрации  $3,5 \times 10^{-5}$  М. В свою очередь, этанол в концентрации 0,2–0,5 % заметно превосходил ресвератрол по ингибирующей активности. Среднее фагоцитарное число в экспериментах снижалось с 5–6 до 2–3 под действием как ресвератрола, так и этанола.

Полученные нами результаты, а также данные ряда других авторов [3, 4] подтверждают, что ресвератрол и этанол действительно проявляют иммуносупрессивное действие в отношении клеточного звена иммунитета.

### **Выводы**

Ресвератрол и растворы этанола в концентрациях от 0,05 % до 0,5 % ингибируют митоген-активированную пролиферацию лимфоцитов и фагоцитоз культуры *S. aureus* лейкоцитами периферической крови человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Yu, W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease / W. Yu, Y. C. Fu, W. Wang // J. Cell. Biochem. 2012. Vol. 113, N 3. P. 752–759.
2. *Фитоалексин* ресвератрол : методы определения, механизмы действия, перспективы клинического применения / А. М. Моисеева [и др.] // Вестник фармации. 2012. № 1 (55). С. 63–73.
3. *Effects* of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release / P. Boscolo [et al.] // Ann. Clin. Lab. Sci. 2003. Vol. 33. P. 226–231.
4. *Polyphenol* derivatives — potential regulators of neutrophil activity / K. Drabikova [et al.] // Interdiscip. Toxicol. 2012. Vol. 5, N 2. P. 65–70.

***Generalova A. G., Korotina O. L., Moiseeva A. M., Zheleznyak N. V.***

### **Effect of resveratrol and ethanol on proliferative activity of the lymphocytes and phagocytic activity of neutrophils**

The influence of resveratrol, resveratrol-containing extractions and ethanol on phagocytosis and mitogen-induced proliferative capacity of lymphocytes was studied. It has been found that resveratrol and ethanol in various concentrations suppress the reactions of cellular immune response including phytohemagglutinin-dependent lymphocyte transformation and microbial phagocytosis.