

Коротина О. Л.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Юнатов Ю. Г.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Железняк Н. В.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Генералов И. И.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

ИММУНОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕСВЕРАТРОЛА, РЕСВЕРАТРОЛ-СОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ И ЭТАНОЛА

Полифенол растительного происхождения ресвератрол (*trans*-3,4',-5-тригидроксистерилбен) относится к фитоалексинам — растительным гормонам с эстрогеноподобным действием. Максимальное количество ресвератрола обнаружено в корнях растения *Polygonum cuspidatum* (средство традиционной японской медицины Ко-дзе-кон [1]). Повышенное содержание ресвератрола отмечается в кожуре и косточках красных сортов винограда (сортов Мускатель, Пино-Фран, Каберне, Мерло и многих других). Возможно, именно наличием ресвератрола хотя бы частично объясняется так называемый «французский парадокс»: употребление в больших количествах красного вина жителями Франции и других средиземноморских государств делает их менее чувствительными к негативным последствиям высококалорийной диеты с повышенным содержанием жиров [1].

В результате многочисленных исследований, проведенных в последние годы, обнаружено, что ресвератрол обладает весьма широким спектром биологической активности. Среди всех свойств ресвератрола заметную роль играет его установленное противовоспалительное действие. Данный эффект определяется, в первую очередь, подавлением синтеза провоспалительных цитокинов, регулируемых через фактор транскрипции NF- κ 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. Благоприятные фармакологические эффекты ресвератрола послужили основой для его активных клинических испытаний в профилактике ишемической болезни сердца, болезни Альцгеймера, онкопатологии (рака предстательной железы, желудка, меланомы, щитовидной железы, колоректального рака). При этом его назначают как самостоятельно, так и в составе биодобавок и извлечений растительного происхождения [цит. по 2].

С учетом вышеизложенного, очевидный интерес представляет оценка действия ресвератрола и ресвератрол-содержащих растительных экстрактов на основные звенья клеточного и гуморального иммунитета. В отдельных работах изуча-

лось влияние ресвератрола на фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, а также пролиферативную активность лимфоцитов [3, 4]. В свою очередь, действие ресвератрола на каталитическую (или абзимную) активность иммуноглобулинов до сих пор не исследовалось.

Следует отметить, что существует ряд методических трудностей, препятствующих точному определению биологической активности ресвератрола как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Гидрофобность молекулы ресвератрола обеспечивает его хорошее прохождение через биомембраны, но вследствие этого он мало растворим в воде и водных растворах. Отсюда в иммунологических экспериментах в качестве растворителя для него использовали этанол в различных концентрациях [3] или водный раствор диметилсульфоксида (ДМСО) [4]. Однако ранее во многих исследованиях было показано, что этанол обладает самостоятельным иммуносупрессивным действием, особенно в отношении клеточного иммунного ответа. Хроническое или острое воздействие этанола приводит к развитию вторичного иммунодефицита [5]. Вследствие этого, иммуотропное действие ресвератрола и его солюбилизаторов (этанола или ДМСО) должно изучаться отдельно.

Таким образом, **целью** настоящего исследования стала оценка влияния ресвератрола, ресвератрол-содержащих растительных экстрактов и солюбилизатора ресвератрола (этанола) на ряд показателей, характеризующих состояние системы иммунитета человека: пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены; фагоцитоз микроорганизмов лейкоцитами; каталитическую (или абзимную) активность иммуноглобулинов класса G.

Материалы и методы. Анализ ресвератрола проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent с использованием колонок Zorbax Stable-Bond 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 C8- или C16-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 выполнения данных методов венозную кровь здоровых добровольцев ($n = 2$) забирали натощак с гепарином в количестве 50 Ед на 10 мл, отстаивали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов. Обогащенную лейкоцитами плазму использовали для реакций. Оптимальные дозы митогенов подбирались в предварительных экспериментах. Так как ранее было показано [5], что этанол может обладать иммуносупрес-

сивным действием, особенно в отношении клеточного иммунитета, 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 $0,5 \cdot 10^{-5}$ 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 $3,5 \cdot 10^{-5}$ 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.

Для оценки действия ресвератрол-содержащих соединений на абзимную активность IgG изучали ДНКазную, протеолитическую (БАПНА-амидазную) и пероксидазную активность иммуноглобулинов.

Иммуноглобулины G выделяли из крови пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями (реактивным хламидийным артритом, гнойной хирургической инфекцией, $n = 8$) при помощи комбинированного риванол-аффинно-хроматографического метода с использованием агарозы, конъюгированной с рекомбинантным протеином А (Pierce, США).

Контрольный электрофорез образцов иммуноглобулинов в полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях в системе буферов по Леммли с окраской Кумасси R250 и нитратом серебра подтвердил их гомогенность.

Полученные препараты IgG применяли для постановки абзимных реакций. Определение ДНКазной абзимной активности проводили методом предупреждения образования риванолового сгустка [6]. Время инкубации реакционной смеси составляло 20 часов. Уровни активности выражали в баллах по 6-балльной шкале.

Для определения протеолитической абзимной активности был использован модифицированный метод Эрлангера с сотр. [7]. Синтетическим субстратом для данной реакции является бензоил-DL-аргинин-р-нитроанилид (БАПНА) производства Sigma, США. Использовали планшетную микромодификацию данного метода. После инкубации в течение 20 часов учет реакции проводили на фотометре Ф300 производства РУП «Витязь», Республика Беларусь (одноволновое измерение на 405 нм). Результаты выражали в единицах прироста оптической плотности.

Для определения пероксидазной абзимной активности в качестве субстратов использовали пероксид водорода и хромоген тетраметилбензидин производства Sigma, США. Реакцию инкубировали при 37 °С, начиная с 10 минут и доводя максимальное время инкубации до 20 часов. По окончании инкубации реакцию останавливали добавлением 1 н H₂SO₄ и фотометрировали на фотометре Ф300 при 450 нм. Во всех случаях выполняли 3 варианта контролей — только с 0,15 М NaCl; отдельно — с растворителем (ДМСО или этанол) в 0,15 М NaCl и отдельно — с ресвератролом без IgG.

Статистическую обработку результатов проводили на компьютере с использованием пакетов прикладных статистических программ. Использовали методы описательной статистики. При сравнении двух выборок применяли критерии Стьюдента и Вилкоксона–Манна–Уитни.

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 $0,5 \cdot 10^{-5}$ 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 $3,5 \cdot 10^{-5}$ 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, 5] подтверждают, что ресвератрол и этанол действительно проявляют иммуносупрессивное действие в отношении клеточного звена иммунитета.

Далее, при анализе протеолитической (БАПНА-амидазной) активности было установлено, что ресвератрол может самостоятельно ускорять гидролиз амидной связи в синтетическом субстрате. Реакция ускорялась ~ на 25 % по сравнению со спонтанным гидролизом субстрата ($p < 0,01$). Сходные количественные результаты были получены и в опытных пробах, содержащих только IgG или IgG+ресвератрол. Это свидетельствует в пользу того, что ресвератрол лишь умеренно влияет на абзимную протеолитическую активность, и ускорение распада субстрата может быть связано с аддитивным влиянием ресвератрола на гидролиз БАПНА в присутствии иммуноглобулинов.

Весьма выраженным влиянием ресвератрол обладал на пероксидазную абзимную реакцию. В условиях эксперимента происходило полное ингибирование пероксидазных IgG. Такой результат в целом не является неожиданным и подтвер-

ждает наличие у данного фитоалексина собственной мощной антиоксидантной активности.

Наконец, действие ресвератрола на ДНКазную абзимную реакцию носило разнонаправленный характер. Из 8 исследованных образцов IgG в 2 случаях активность усилилась, в 1-м — снизилась, в остальных не изменилась. Изменения были незначительными (в пределах 1–2 баллов по качественной шкале оценки). Однако интересен факт, что в контроле ресвератрол самостоятельно проявил невыраженную, однако отчетливую собственную ДНКазную активность.

Достаточно неожиданные результаты были получены при анализе влияния исходного этанольного экстракта из горца татарского на ДНКазную абзимную активность IgG пациентов с гнойной хирургической инфекцией. Самостоятельной ДНКазной активностью экстракт не обладал. Однако при инкубации с иммуноглобулинами и ДНК в 3 препаратах из 6 наблюдалось усиление активности. При этом в 2-х из них исходно активность отсутствовала (индукция абзимной активности). С учетом того, что сам ресвератрол не проявлял подобного действия, это указывает на наличие в экстракте из горца татарского пока не идентифицированных фракций, которые могут генерировать абзимную ДНКазную активность IgG, выступая в роли кофакторов. Последнее предположение, безусловно, требует тщательной проверки и проведения дальнейших исследований.

Выводы:

1. 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.

2. Действие ресвератрола на абзимную активность поликлональных иммуноглобулинов имеет разнонаправленный характер: ресвератрол полностью подавляет пероксидазную активность IgG, умеренно активирует их протеолитическую активность и лишь незначительно влияет на нуклеазную абзимную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Das, D. K. Resveratrol in cardioprotection : a therapeutic promise of alternative medicine / D. K. Das, N. Maulik // Mol. Intervent. 2006. Vol. 6, № 1. P. 36–47.
2. Фитоалексин ресвератрол : методы определения, механизмы действия, перспективы клинического применения / А. М. Моисеева А [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, № 2. P. 65–70.
5. Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on host defence / G. Szabo // Alcohol. Alcoholism. 1999. Vol. 34, № 6. P. 830–841.
6. Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость дезоксирибонуклеазной активности поликлональных IgG и сыворотки крови при спондилоартритах / М. В. Волкова [и др.] // Медицинская иммунология. 2012. Vol. 14, № 4–5. С. 337–346.
7. Горячковский, М. А. Справочное пособие по клинической биохимии / М. А. Горячковский. Одесса : ОКФА, 1994. С. 225–228.