

А. В. Лебедев, М. С. Коротаева, Н. С. Фурса, И. В. Чикина

Влияние извлечений некоторых лекарственных растений на адгезию лейкоцитов

Исследовано влияние водных и неводных извлечений из ряда лекарственных растений на адгезионную способность лейкоцитов. Для этого использован способ контроля адгезии лейкоцитов при их пропускании через нейлоновое волокно «Гисанс» и разработана модифицированная методика анализа адгезии лейкоцитов применительно к лекарственным растениям. Установлена активность некоторых лекарственных растений в отношении адгезионной способности лейкоцитов.

Ключевые слова: лейкоциты, адгезия, нейлоновое волокно, лекарственное растение.

A. V. Lebedev, M. S. Korotaeva, N. S. Fursa, I. V. Chikina

Influence of Some Extracts of Herbs for Adhesion of Leucocytes

Influence of water and nonaqueous extractions from a number of herbs on the adhesive ability of leucocytes is investigated. It was used a way of control of leucocytes' adhesion at their transmission through the nylon «Gisans» fiber and the modified technique to analyse leucocytes' adhesion in relation to herbs was worked out. Activity of some herbs concerning the adhesive ability of leucocytes was determined.

Keywords: leucocytes, adhesion, a nylon fiber, a herb.

Введение

По данным ВОЗ, за последнее время повысилась заболеваемость и смертность от патологий системы кровообращения. Велика доля катастроф, вызванных закупоркой коронарных сосудов и капилляров головного мозга. Зарубежными исследователями установлено, что в процессе развития данных состояний существенную роль играют лейкоциты, наряду с другими форменными элементами [11]. Кроме того, лейкоциты, являясь важнейшей составной частью клеточного иммунитета, принимают непосредственное участие в патогенезе таких заболеваний, как ревматические, онкологические, сердечнососудистые, инфекционные [12].

Важнейшее реологическое свойство лейкоцитов – их способность к адгезии («прилипанию») к сосудистой стенке [13, 14]. Именно это явление имеет значение в развитии вышеуказанных патологий и заслуживает дальнейшего всестороннего изучения.

В литературе отсутствуют данные о влиянии на адгезию фитопрепаратов как *in vivo*, так и *in vitro*. С учетом возросшего в последнее время интереса к фитотерапии как к более «мягкому», безопасному методу лечения [4] нам представилось важным изучить возможные эффекты, оказываемые растительными препаратами на реологические свойства клеток крови, а в частности

лейкоцитов, что представляет, по нашему мнению, не только научный, но и большой практический интерес.

Цель данного исследования заключалась в изучении влияния извлечений из сырья некоторых лекарственных растений на адгезионную способность лейкоцитов. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

- обобщить имеющиеся литературные данные по интересующему нас вопросу;
- разработать методику контроля влияния извлечений из лекарственных растений на адгезионную способность лейкоцитов и оценить чувствительность этой методики;
- исследовать возможное изменение реологических свойств лейкоцитов под влиянием водных и спиртовых извлечений из широко известных лекарственных растений.

Материал и методы

Предварительно заготавливали кровь здоровых добровольцев, из которой получали **лейкоконцентрат** по следующей методике. Свежую кровь центрифугировали при 2750 об/мин в течение 15 мин. до появления ясно видимой белой пленки лейкоцитов и осветления плазмы, затем шприцем отбирали лейкоцитарное кольцо, стараясь не захватить избыток нижнего слоя. Отобранную часть помещали в пробирку, заливали 0,84 % раствором хлорида аммония, оставляли

на 10–15 мин для гемолиза эритроцитов, затем снова центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость шприцем. Для полной очистки раствора от эритроцитов операцию повторяли несколько раз. Белый осадок лейкоцитов заливали раствором Дюльбекко, ресуспендировали и снова центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли.

Рабочую суспензию лейкоцитов готовили следующим образом. Осадок лейкоцитов заливали небольшим количеством раствора Дюльбекко. Суммарную лейкомассу, полученную из 100 мл крови, ресуспендировали в 2 мл раствора Дюльбекко. Эту смесь тщательно встряхивали в течение 5 мин до получения равномерной непрозрачной суспензии желтовато-молочного цвета без видимых комочков.

Контрольный опыт без извлечений и без пропускания через волокно организовали следующим образом. 100 мкл приготовленной суспензии смешивали с 900 мкл раствора Дюльбекко, получив разведение суспензии 1:10. Отбирали 50 мкл этой смеси, смешивали в другой пробирке с 50 мкл 0,15 % раствора метиленового синего. Небольшое количество смеси помещали в камеру Горяева. При увеличении 20х15 считали количество лейкоцитов в 5 больших квадратах и находили среднее количество в одном квадрате (табл. 1). **Контрольный опыт без извлечений с пропусканием через волокно.** 100 мкл приготовленной суспензии смешивали с 900 мкл раствора Дюльбекко. 1 мкл смеси отбирали в инсулиновый шприц объемом 1 мл со съемной иглой, куда предварительно помещали 30 мг специального нейлонового волокна ГИСАНС для сепарации лейкоцитов, равномерно набивали до отметки «20». Шприц помещали в пробирку для сбора фильтрата, ставили в термостат на 10 мин. при температуре 37° С. Затем 50 мкл фильтрата смешивали в отдельной пробирке с 50 мкл раствора метиленового синего и производили подсчет в камере Горяева. По результатам серии опытов рассчитывали индекс адгезии ИА.

$$ИА = 100 \% - \frac{N_{\text{лейк. после пропускания}}}{N_{\text{лейк. до пропускания}}} \times 100,$$

где N – число лейкоцитов, л/кв.

Результаты представлены в табл. 1.

Чувствительность метода определили после серии 18 контрольных опытов с водой. Среднее арифметическое значение ИА составило 27,9 %. Стандартное отклонение S – 9,27. Коэффициент вариации – 13,93, что меньше 20, поэтому чувствительность методики признали удовлетворительной.

Для исключения влияния спирта на лейкоциты провели дополнительную серию **контрольных опытов без извлечений со спиртом с пропусканием через волокно**. К 100 мкл суспензии и 400 мкл спирта, разведенного в 10 раз, добавляли 500 мкл раствора Дюльбекко. Естественно, что спирт уменьшал адгезию (в исследуемой концентрации на 11,4 %), то есть его влияние в опытах нами, безусловно, учитывалось (табл. 1).

Объектами исследования мы избрали спиртовые настойки травы зверобоя продырявленного (*herba Hyperici perforati*), ортилии однобокой (*herbae Orthiliae secundae*), цветков календулы лекарственной (*flores Calendulae*), корневищ с корнями валерианы лекарственной (*rhizomata cum radicibus Valerianae*), травы пустырника (*herbae Leonuri*), шишек хмеля обыкновенного (*strobili Lupuli*), спиртовой экстракт корней элеутерококка (*radices Eleutherococci*), водные настои побегов багульника (*Cormi Ledi*) и листьев малины (*folia Rubi idaei*).

Настойки из травы ортилии, цветков календулы, травы зверобоя готовили на 70 % спирте в соотношении 1:5 [5]. Затем их разводили водой в 10 раз, чтобы уменьшить влияние спирта на лейкоциты. 400 мкл 7 % настойки смешивалась с 1000 мкл раствора Дюльбекко. Итоговая концентрация спирта при этом получилась 2,8 %. Настой из побегов багульника готовили следующим образом: сухое сырье отвешивали на аптечных весах, помещали в колбу, заливали рассчитанным количеством дистиллированной воды в соотношении 1:100 и нагревали на кипящей водяной бане 15 мин., затем охлаждали при комнатной температуре 45 мин., после чего фильтровали в сосуд через складчатый фильтр. Настой из листа малины готовили в соотношении 1:20 [2].

Результаты и их обсуждение

В отечественной и зарубежной литературе имеется достаточно данных о влиянии биологически активных веществ лекарственных растений на систему крови, в том числе на ее реологические свойства [4, 6]. Однако особенности биомеханического поведения лейкоцитов при воздействии на них сложных фитохимических соединений практически не изучены.

Результаты нашего исследования и их статистическая обработка представлены в табл. 1 и 2. При изучении влияния извлечений из ЛРС на адгезионную способность лейкоцитов выявили, что все растения повышают адгезию лейкоцитов.

Таблица 1. Результаты исследования адгезионной активности извлечений из ЛРС

	Контроль вода	Контроль спирт	Настойка зверобоя	Настойка ортисии	Настойка календулы	Настойка валерианы	Настойка пустырника	Настойка хмеля	Экстракт элеутерококка	Настойка багульника	Настойка малины
N _{ср} до пропускания	12,2	9,0	7,8	16,0	20,3	15,2	9,6	5,2	13,24	21,4	17,2
N _{ср} после пропускания	8,4	7,24	3,04	3,25	10,96	7,1	4,68	3,44	8,72	12,62	9,56
ИФ, %	68,8	80	39	44,3	54,5	46,7	48,8	66,15	66,0	58,97	55,6
ИА, %	31,2	20	61	55,7	46,0	53,3	51,2	33,85	34	41,03	44,4

ИФ – индекс адгезии, отношение числа прошедших через волокно клеток к начальному их числу;

ИА – индекс адгезии (100 %-ИФ).

Таблица 2. Статистическая обработка результатов исследования

	Контроль вода	Контроль спирт	Настойка зверобоя	Настойка ортисии	Настойка календулы	Настойка валерианы	Настойка пустырника	Настойка хмеля	Экстракт элеутерококка	Настойка багульника	Настойка малины
ИА	31,2	18,1	61,0	55,7	46,0	52,8	51,4	34,2	34,2	40,8	55,9
	32,5	20,0	58,9	56,9	44,2	51,1	49,3	32,3	36,1	43,1	55,1
	33,2	20,1	62,2	60,3	45,9	53,0	50,8	33,4	33,5	41,3	53,6
	31,1	21,5	59,3	57,6	46,1	55,2	51,4	33,5	33	41,2	55,5
	29,2	20,3	63,2	58,0	48,0	53,9	53,1	35,9	34,3	39,0	57,5
Среднее	31,44	20,0	60,92	57,7	46,04	53,2	51,2	33,86	34,22	41,08	55,52
Станд. отклонение	1,53	1,22	1,84	1,70	1,35	1,51	1,37	1,33	1,18	1,46	1,41
Ошибка сред.	0,67	0,55	0,83	0,76	0,6	0,67	0,61	0,59	0,53	0,65	0,63
КВ, %	4,88	6,10	3,02	2,94	2,92	2,82	2,67	3,92	3,44	3,56	2,52

Настойка зверобоя при смешивании с раствором Дюльбекко дала хлопьевидный осадок, что мы связываем с активностью полифенольных окисляемых соединений зверобоя в отношении лейкоцитарной суспензии. Индекс адгезии настойки зверобоя составил 61 %, то есть адгезия увеличилась на 30 % по сравнению с контролем.

Настойка ортисии показала индекс адгезии 57,7 %, то есть достоверное увеличение адгезии на 27 %. Настойка календулы повышала адгезионную способность лейкоцитов на 15 % (ИА составил 46 %). Настойка валерианы достоверно увеличивала адгезионную способность на 22 % по сравнению с контролем.

При исследовании настойки пустырника выявили, что индекс адгезии составил 51,2 %, что увеличивало адгезию по сравнению с контролем на 20 %.

Настойка хмеля увеличивала адгезию всего на 3 % (ИА составил 33,86 %).

Экстракт элеутерококка показал аналогичный невысокий результат – 3 % (ИА = 34,22 %).

Настой багульника достоверно увеличивал адгезионную способность на 10 % при ИА 41,08 %.

Настой малины также проявил активность в отношении реологических свойств лейкоцитов. Адгезионная способность увеличилась на 24 % по сравнению с контрольным опытом. При этом в суспензии наблюдался эффект, подобный настойке зверобоя, вероятно, связанный с реагированием биологически активных веществ малины с лейкоконцентратом.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы разработали методику определения влияния извлечений из ЛРС на степень адгезии

лейкоцитов. Достоверно установлено, что эта методика имеет удовлетворительную чувствительность как для водных (багульник, малина), так и для спиртовых (зверобой, ортилия, хмель, календула, валериана, пустырник, элеутерококк) извлечений. При этом максимально устранили возможное влияние растворителей извлечений на итоговый

результат. При исследовании извлечений из разных лекарственных растений установлено, что все они оказывали воздействие на адгезионную способность лейкоцитов. При этом наибольшую активность проявляла настойка зверобоя, а наименьшую – настойка хмеля.

Библиографический список

1. Александров, А. А. Анализ механизма модуляции межклеточных молекул адгезии [Текст] / А. А. Александров // Иммунология. – 1997. – С. 4–12.
2. Аносова, О. Г. Совершенствование анализа и технологии настоев и отваров, содержащих флавоноиды [Текст] / О. Г. Аносова [и др.] // Фармация. – 2004. – № 1. – С. 30–34.
3. Блиндарь, В. Н. Адгезионная способность нейтрофилов периферической крови в норме и у онкологических больных [Текст] / В. Н. Блиндарь // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – № 5. – С. 21–23.
4. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений [Текст] / В. П. Георгиевский. – Новосибирск : Наука, Сиб. отд-е, 1990. – 333 с.
5. Государственная Фармакопея СССР. – 11 изд. – М. : Медицина, 1990. – Вып. 2 – 396 с.
6. Карепова, Т. В. Изучение химического состава ортилии однобокой [Текст] / Т. В. Карепова [и др.] // Сборник статей 4-го Конгресса молодых ученых «Наука о человеке». – Томск, 2003. – С. 219–220.
7. Мацнер, Я. Я. Исследование функций нейтрофилов в клинической медицине. Адгезия, фагоцитоз и бактерицидность [Текст] / Я. Я. Мацнер // Гематология и трансфузиология. – 1993. – Т. 38, № 9. – С. 39–42.
8. Польшнер, А. А. Роль молекул адгезии в аллергическом воспалении при бронхиальной астме, аллергическом рините и других заболеваниях [Текст] / А. А. Польшнер // Иммунология. – 1998. – № 2. – С. 13–17.
9. Редчиц, Е. Г. Роль адгезии лейкоцитов в фильтруемости клеток крови [Текст] / Е. Г. Редчиц [и др.] // Бюлл. экспериментальной биологии. – 2002. – № 5. – С. 156–160.
10. Семенова, О. Н. Функциональные свойства лейкоцитов крови в норме и при экспериментальном перитоните [Текст] : дисс. ... канд. биол. наук / О. Н. Семенова. – Ярославль, 2000. – 130 с.
11. Bagge, U. et al. White blood cell rheology // Adv. Microcirculation. – 1987. – V. 7. – P. 1–17.
12. Brathlowsky, K. P. Ann. Rev. Immunol., 11, 767–804.
13. Honn, K. V. Cancer Metastasis Rev. 2002, 11, 353–375.
14. Ley, K. An adhesion of leucocytes as biological phenomenon. – Oxford. – 2000. P. 35–39.
15. Rainger, G. E. Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro // Amm J. Physiol. – 1995. – Vol. 269. – P. H1398–H1406.
16. Spertini, O. Regulation de la migration leukocytaire par les molecules de adhesion // Schweiz. Med. Wochenscr. – 2006. – 126, M45 – P. 1926–1934.

Bibliograficheskij spisok

1. Aleksandrov, A. A. Analiz mehanizma moduljacji mezhkletocznyh molekul adgezii [Tekst] / A. A. Aleksandrov // Immunologija. – 1997. – S. 4–12.
2. Anosova, O. G. Sovershenstvovanie analiza i tehnologii nastoev i otvarov, sodержashhih flavono-idy [Tekst] / O. G. Anosova [i dr.] // Farmacija. – 2004. – № 1. – S. 30–34.
3. Blindar', V. N. Adgezionnaja sposobnost' nejtrofilov perifericheskoj krovi v norme i u on-kologicheskikh bol'nyh [Tekst] / V. N. Blindar' // Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. – 1998. – № 5. – S. 21–23.
4. Georgievskij, V. P. Biologicheskij aktivnyje veshhestva lekarstvennyh rastenij [Tekst] / V. P. Georgievskij. – Novosibirsk : Nauka, Sib. otd-e, 1990. – 333 s.
5. Gosudarstvennaja Farmakopeja SSSR. – 11 izd. – M. : Medicina, 1990. – Vyp. 2 – 396 s.
6. Karepova, T. V. Izuchenie himicheskogo sostava ortilii odnobokoj [Tekst] / T. V. Karepova [i dr.] // Sbornik statej 4-go Kongressa molodyh uchenykh «Nauka o cheloveke». – Tomsk, 2003. – S. 219–220.
7. Macner, Ja. Ja. Issledovanie funkcij nejtrofi-lov v klinicheskoj medicine. Adgezija, fagocitoz i baktericidnost' [Tekst] / Ja. Ja. Macner // Gematologija i transfuziologija. – 1993. – T. 38, № 9. – S. 39–42.
8. Pol'ner, A. A. Rol' molekul adgezii v allergicheskom vospalenii pri bronhial'noj astme, allergicheskom rinite i drugih zabolevanijah [Tekst] / A. A. Pol'ner // Immunologija. – 1998. – № 2. – S. 13–17.
9. Redchic, E. G. Rol' adgezii lejkcitov v fil'truemosti kletok krovi [Tekst] / E. G. Redchic [i dr.] // Bjull. jeksperimental'noj biologii. – 2002. – № 5. – S. 156–160.
10. Semenova, O. N. Funkcional'nye svojstva lejkcitov krovi v norme i pri jeksperimental'nom peritonite [Tekst] : diss. ... kand. biol. nauk / O. N. Semenova. – Jaroslavl', 2000. – 130 s.
11. Bagge, U. et al. White blood cell rheology // Adv. Microcirculation. – 1987. – V. 7. – P. 1–17.

12. Brathlowsky, K. P. Ann.Rev.Immunol., 11, 767–804.
13. Honn, K. V. Cancer Metastasis Rev. 2002, 11, 353–375.
14. Ley, K. An adhesion of leucocytes as biological phenomenon. – Oxford. – 2000. P. 35–39.
15. Rainger, G. E. Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro // Ann J.Physiol. – 1995. – Vol.269. – P. H1398–H1406.
16. Spertini, O. Regulation de la migration leukocytaire par les molecules de adhesion // Schweiz. Med.Wochenscr. – 2006. – 126, M45 – P. 1926–1934.