

УДК 579:615.37

Антимикробное и иммуномодулирующее действие ресвератрола и ресвератрол-содержащих растительных экстрактов

О.Л. Коротина¹, И.В. Зубарева¹, Ю.Г. Юпатов², Д.В. Моисеев¹, И.И. Генералов¹

Витебский государственный медицинский университет¹
ГУЗ ВГЦП Поликлиника № 4 им. В.И. Ленина г. Витебска²

Antimicrobial and immunomodulatory activity of resveratrol and resveratrol-containing plant derivatives

O.L. Korotina¹, I.V. Zubareva¹, Yu.G. Yupatov², D.V. Moiseev¹, I.I. Generalov¹

Vitebsk State Medical University¹
SHU VCCP V.I.Lenin's Polyclinics № 4, Vitebsk²

Аннотация

Цель данного исследования стала оценка антимикробной и иммуномодулирующей активности фитоалексина ресвератрола, его солюбилизатора (этанола) и ресвератрол-содержащих растительных экстрактов.

Первоначально были разработаны методики количественного определения ресвератрола, а также способы получения извлечений из растительных источников, обогащенных по содержанию ресвератрола. Проведен широкий скрининг наличия ресвератрола в пищевом и непищевом растительном сырье. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлено наличие и количество ресвератрола в экстрактах из кожуры ягод красного винограда (*Vitis vinifera*). Впервые обнаружено повышенное содержание ресвератрола в корневищах растения *Polygonum tataricum* (горца татарского). В образцах из других видов, относящихся к роду *Polygonum*, ресвератрол выявлен не был.

Ресвератрол и ресвератрол-содержащие растительные экстракты обладали умеренной антимикробной активностью в отношении ряда возбудителей: псевдомонад, бацилл, грибов *Candida albicans*. Минимальная ингибирующая концентрация ресвератрола для них составила 100 мкг/мл и более.

Ресвератрол и его солюбилизатор (этанол) проявляли выраженное антипролиферативное действие в отношении культур лимфоцитов, а также ингибировали фагоцитоз. Кроме того, ресвератрол полностью блокировал абзимную пероксидазную активность IgG и при этом разнонаправленно влиял на абзимы с ДНКазной активностью.

Ключевые слова

Ресвератрол, этанол, иммуномодулирующая активность, антимикробная активность, лимфоциты, фагоцитоз, абзимы.

Summary

The main goal of the study implied the assessment of antimicrobial and immunomodulatory activity of phytoalexin resveratrol, its solubilizer (ethanol) and resveratrol-containing plant derivatives.

Primarily, the methods for quantitative determination of resveratrol as well as the methods of extraction of resveratrol-enriched plant derivatives were elaborated.

A broad screening of resveratrol in food and non-food plant raw was performed. Resveratrol content in extractions from red grape skins (*Vitis vinifera*) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. For the first time the elevated quantity of resveratrol was found in the roots of herb *Polygonum tataricum*. Analysis of other studied *Polygonum* species didn't reveal the presence of resveratrol.

Resveratrol and resveratrol-containing extractions demonstrated the modest antimicrobial action against some infectious agents: pseudomonads, bacilli, *Candida albicans* fungi. For these pathogens minimal inhibitory concentration of resveratrol was found to be 100 µg/ml or more.

At the same time resveratrol and its solubilizer (ethanol) exhibited evident anti-proliferative effects in lymphocyte cell cultures and noticeably suppressed phagocytosis. In addition, resveratrol completely inhibited IgG abzymes with peroxidase activity, whereas its influence on DNase abzymes was variable.

Keywords

Resveratrol, ethanol, immunomodulatory activity, antimicrobial activity, lymphocytes, phagocytosis, abzymes

Актуальность работы

Ресвератрол (*trans*-3,4',-5-тригидроксиптильбен) относится к группе растительных полифенолов. Первоначально было показано, что данное соединение является фитоалексином – растительным гормоном с эстрогеноподобным действием. Максимальное количество ресвератрола обнаружено в корнях растения *Polygonum cuspidatum*. Повышенное содержание ресвератрола отмечается в кожуре и косточках красных сортов винограда (сортов Мускатель, Пино-Фран, Каберне, Мерло и многих других). Дальнейшие исследования подтвердили, что ресвератрол входит в состав биомассы многих растений, включая сою и различные ягоды, содержащие растительные пигменты и комплекс антиоксидантов (шелковица, черника, голубика, клюква, земляника и др.) 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 исследований, проведенных в последние годы, обнаружено, что ресвератрол обладает весьма широким спектром биологической активности. Проанализированы научные результаты, указывающие на благоприятные эффекты ресвератрола в отношении самых разных патологических состояний. Препарат активирует апоптоз раковых клеток и подавляет его в кардиомиоцитах при ишемии. Угнетает ангиогенез в опухолевой ткани, однако усиливает неоваскуляризацию при хронической ишемии в миокарде. Данное соединение проявляет нейропротективный эффект, а также влияет на метаболизм лекарственных препаратов через цитохром P-450. Изменяет активность стероидных гормонов (цит. по [2]).

В ряде исследований показано, что препарат может обладать собственной противовоспалительной активностью. Данный эффект обусловлен, в первую очередь, подавлением синтеза провоспалительных цитокинов, регулируемых через фактор транскрипции NF-κB [3, 4]. Имеются указания, что ресвератрол ингибирует синтез эйкозаноидов, подавляя активность циклооксигеназы и липоксигеназы [5]. В отдельных работах изучалось влияние ресвератрола на фагоцитарную активность нейтрофилов

и макрофагов, а также пролиферативную активность лимфоцитов [6, 7].

Кроме того, появились первые указания на антимикробную активность ресвератрола. Отмечается подавление роста вирулентных Sg9+ штаммов *Helicobacter pylori* под влиянием данного соединения [8]. Продемонстрирована возможность угнетения роста грибковых патогенов ресвератролом [9]. Также этот полифенол подавляет активность ряда бактерий, например протей, гонококков, псевдомонад, протей [10, 11]. Имеются сообщения о противовирусном действии соединения [12].

В целом наблюдается взрывной рост количества публикаций по всем этим направлениям. Если до середины 90-х годов по ресвератролу имелись лишь отдельные сообщения, то за последние 10 лет опубликовано более 3,5 тысяч работ многочисленными исследовательскими группами из США, Японии, Евросоюза, Китая, Индии. В настоящее время выполняется более 60 клинических испытаний химических препаратов и/или растительных извлечений-биодобавок, содержащих ресвератрол, в ведущих институтах и клиниках мира (цит. по источнику US National Institute of Health; www.clinicaltrials.gov).

Несмотря на потенциально высокую терапевтическую ценность, до сих пор не изучено содержание ресвератрола в растениях, произрастающих или доступных к использованию в Республике Беларусь. Кроме того, необходима разработка собственных методов получения растительных извлечений и их фракций с повышенными концентрациями данного фитоалексина.

С учетом уже имеющихся сведений, очевидный интерес представляет изучение влияния ресвератрола и ресвератрол-содержащих растительных экстрактов на основные звенья клеточного и гуморального иммунитета, а также оценка антимикробной активности ресвератрола.

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 [7] или водный раствор диметилсульфоксида (ДМСО), [13, 14]. Однако ранее в многочисленных исследованиях было показано, что этанол обладает самостоя-

тельным иммуносупрессивным действием, особенно в отношении клеточного иммунного ответа. Хроническое или острое воздействие этанола приводит к развитию вторичного иммунодефицита [15]. Вследствие этого, иммуностропное действие ресвератрола и его солибулизаторов (этанола или ДМСО) должны изучаться самостоятельно.

Таким образом, целью настоящего исследования стала оценка действия ресвератрола, ресвератрол-содержащих растительных экстрактов и солибулизатора ресвератрола (этанола) на ряд параметров, характеризующих состояние системы иммунитета человека (пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены; фагоцитоз микроорганизмов лейкоцитами; каталитическую абзимную активность иммуноглобулинов) и определение антимикробной активности ресвератрол-содержащих материалов в отношении бактериальной микрофлоры и грибковых патогенов.

Методы исследований

Качественный и количественный анализ ресвератрола проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent с использованием колонок Zorbax StableBond 5 мкм 250x4,6 мм с диодно-матричным детектированием. В качестве стандарта для экспериментов использовали субстанцию транс-ресвератрола производства Sigma, США (см. Рис. 1). Концентрацию ресвератрола в спиртовых и водных растворах определяли спектрофотометрией на 307 нм (максимум поглощения ресвератрола).

Для оценки антимикробной активности помимо ресвератрол-содержащих извлечений ис-

пользовали препарат «Кардивитол» производства ГП «Академфарм», Республика Беларусь. По данным ВЭЖХ, препарат содержит ресвератрол >95% чистоты (см. Рис. 2).

Водный раствор ресвератрола готовили из препарата «Кардивитол» экстракцией дистиллированной водой при 95°C в течение 1 мин с последующим быстрым охлаждением. Далее раствор фильтровали через фильтры «Millipore», США с диаметром пор 0,1 мкм в стерильный флакон. Конечная концентрация растворенного ресвератрола в воде составила 35 мкг/мл.

В качестве сырья для экстракции ресвератрола использован ряд растительных биоматериалов. К ним относились: (1) разные сорта красного винограда, выращенного в Республике Беларусь и Республике Молдова (свежие ягоды, высушенная измельченная кожура, измельченные высушенные косточки), виноградные соки, красные виноградные вина, полученные из разных сортов винограда; (2) различные виды дикорастущих и культивируемых ягод, собранных в Республике Беларусь (черника, ежевика, клюква, желтый и красный крыжовник, черная и красная смородина, шелковица, земляника, облепиха и др.); (3) другое пищевое сырье – ревеня, фасоль, горох, лук репчатый красный, соевые бобы; (4) непищевое растительное сырье – хвоя ели, сосны, можжевельника, экстракт из тиса, багульника, туи, вереска, цветков клевера, корней чемерицы; (5) лекарственное растительное сырье – высушенная и измельченная трава и корни некоторых видов семейства *Polygonaceae* рода *Polygonum* – горца перечного, горца почечуйного, горца змеиного, горца татарского, горца птичьего.

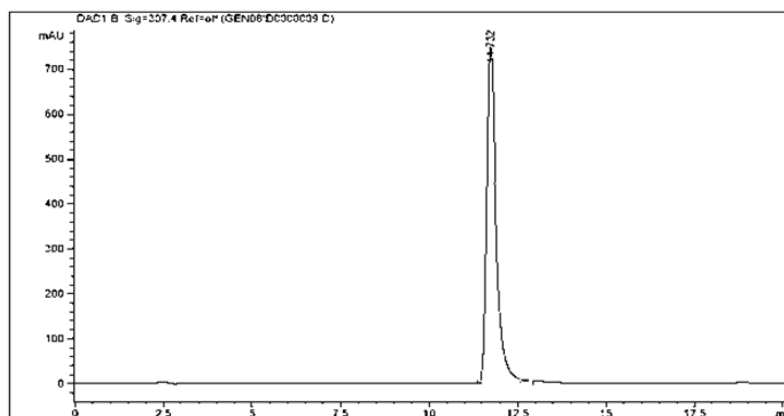


Рис. 1. Хроматографическое определение стандарта ресвератрола

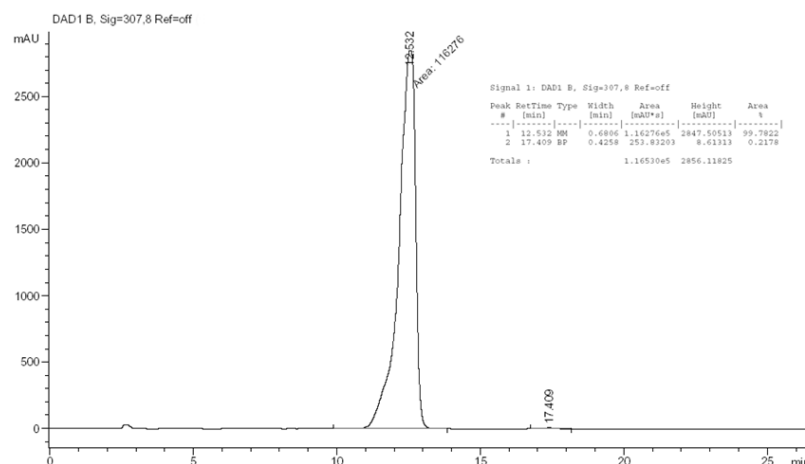


Рис. 2. ВЭЖХ-определение этанольного экстракта биодобавки «Кардивитол»

Были изучены различные варианты предварительной экстракции ресвератрола из образцов измельченного и высушенного сырья. После проведенных экспериментов было выявлено, что оптимальным способом является использование 70% водного раствора этанола в течение 1 ч при $t = 95^{\circ}\text{C}$.

Дальнейшее фракционирование первичных этанольных экстрактов проводили, используя микроколоночный вариант обращенно-фазовой хроматографии на агарозной С8-матрице (октил-агароза пр-ва «Sigma», США) или силикагелевой матрице Диасорб С8 и С16 («Биохиммак», Москва).

Антимикробную активность ресвератрола и содержащих его извлечений оценивали, используя стандартные штаммы *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 8739, *B. subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633, *P. vulgaris*, *C. albicans* ATCC 10231.

Анализ проводили микрометодом серийных разведений в жидкой питательной среде согласно методическим указаниям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [16].

Реакцию выполняли в стерильных полистироловых планшетах. Для культивирования бактерий использовали среду Мюллер-Хинтон. Для выращивания кандид применяли среду Сабуро. Перед добавлением микроорганизмов проводили титрование экстрактов и извлечений на физиологическом растворе в объеме 0,05 мл.

Для увеличения биодоступности ресвератрола при титровании в физиологический раствор

добавляли его солюбилизаторы – этанол или диметилсульфоксид (ДМСО). Для нивелирования их антимикробного действия проводили предварительный подбор концентраций этанола и ДМСО, не влияющих на рост микроорганизмов в контролях. Конечная концентрация солюбилизаторов в реакции составила 5% (этанол) или 10% (ДМСО).

В контроль вместо извлечений вносили тест-штаммы на жидкой питательной среде и физиологический раствор с аналогичным количеством растворителей. После внесения микроорганизмов посева с бактериальными культурами инкубировали в термостате в течение 20 ч при 37°C , с взвесью кандид – при 37°C в течение 20-48-72 ч.

Учет реакции проводили визуально по ингибированию роста микроорганизмов, сравнивая результаты с показателями контрольных проб или турбидиметрическим методом на фотометре Ф300 производства РУП «Витязь» (Республика Беларусь) с одноволновым измерением оптической плотности в лунках планшета при 620 нм.

Для определения пролиферативной активности лимфоцитов использовали В- и Т-клеточные митогены: бактериальный липополисахарид (ЛПС) *S. flexneri*; лектин фитогемагглютинин (ФГА) производства Gibco, США;

Пролиферативную активность лимфоцитов оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с митогенами, фагоцитоз – по определению фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа лейкоцитов периферической крови.

Для выполнения данных методик венозную кровь забирали натощак с гепарином в количестве 50 Ед на 10 мл, отстаивали при 37°C в течение 3 часов. Обогащенную лейкоцитами плазму использовали для реакций.

При постановке РБТЛ к 0,5 мл суспензии клеток добавляли 2 мл среды RPMI 1640 с глутамином, содержащей 25 мМ НЕРЕС и 24 мМ бикарбоната натрия, 0,2 мл 0,1% раствора канамицина, 0,1 мл раствора гепарина (10 Ед), 0,1 мл митогена (20 мкг ФГА и 10 мкг ЛПС) и 0,1 мл водного раствора ресвератрола или различных концентраций этанола. Оптимальные дозы митогенов подбирались в предварительных экспериментах. Контролем являлась стерильная дистиллированная вода.

После добавления в реакционную смесь для РБТЛ конечная концентрация ресвератрола в ней составляла $0,5 \cdot 10^{-5}$ М. Конечные концентрации этанола в разных пробах РБТЛ были равны 0,01%; 0,05%; 0,2% и 0,5%.

Все пробы дублировали. Инкубацию проводили в атмосфере CO_2 в течение 72 ч. Учет РБТЛ производили прямым морфологическим методом с помощью микроскопа Leica DM 2000 (объектив Leica $\infty/0,17$ HI PLAN 63/0,75; окуляр HC PLAN 10/22). Подсчитывали общее количество бластных клеток на 500 лимфоцитов.

Оценку фагоцитоза проводили в культуральных круглодонных планшетах. Реакцию выполняли по следующей схеме: к 0,1 мл суспензии лейкоцитов ($5 \cdot 10^6$ клеток/мл) на среде RPMI добавляли 0,05 мл взвеси бактерий *S. aureus* на 0,15 М NaCl в концентрации $1 \cdot 10^9$ микробных клеток в 1 мл. Суспензию микробов предварительно инактивировали нагреванием при 90°C в течение 30 мин. Концентрацию микроорганизмов определяли на денситометре McFarland (Biosan, Латвия).

В смесь вносили 0,05 мл водного раствора ресвератрола или этанола в различных концентрациях. Контролем служил стерильный 0,15 М NaCl. Все пробы дублировали. После добавления в среду водного раствора ресвератрола конечная его концентрация составила $3,5 \cdot 10^{-5}$ М. Конечные концентрации этанола в разных разведениях составляли 0,05%; 0,2% и 0,5%, соответственно.

Инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин. По окончании инкубации содержимое лунок переносили в центрифужные пробирки. Центрифугировали при 1200 об/мин на центрифуге с бакетным ротором. Из осадка клеток готовили мазки, окрашивали по Рома-

новскому-Гимзе. Определение фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа проводили с помощью световой микроскопии, как описано выше. Подсчитывали общее количество лейкоцитов и лейкоцитов, содержащих микроорганизмы.

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

Имуноглобулины 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 протеином А золотистого стафилококка.

Контроль чистоты иммуноглобулинов проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в системе буферов по Леммли с окраской Кумасси R250 и нитратом серебра. После выделения образцов IgG из крови пациентов электрофоретический анализ подтвердил их гомогенность.

Полученные препараты IgG применяли для постановки абзимных реакций. Определение ДНКазной абзимной активности проводили методом предупреждения образования риванолового сгустка [17]. 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. [18]. Синтетическим субстратом для данной реакции является бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (БАП-НА) производства «Sigma», США. Использовали планшетную микромодификацию данного метода. После инкубации в течение 20 часов учет реакции проводили на фотометре Ф300 права РУП «Витязь», Республика Беларусь (методика №1, одноволновое измерение на 405 нм). Результаты выражали в единицах прироста оптической плотности (ЕОП, Ед).

Для определения пероксидазной абзимной активности в качестве субстратов использовали пероксид водорода и хромоген тетраметилбензидин (ТМБ) производства «Sigma», США. Реакцию инкубировали при 37°C, начиная с 10 минут и доводя максимальное время инкубации до 6 часов. По окончании инкубации реакцию останавливали добавлением 1 н H_2SO_4 и фотометрировали на фотометре Ф300 при 450 нм.

Во всех случаях выполняли 3 варианта контролей – только с 0,15M NaCl; отдельно – с растворителем (ДМСО или этанол) в 0,15M NaCl и отдельно – с ресвератролом без IgG.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакетов прикладных статистических программ. Использовали методы описательной статистики. Характер распределения изучаемых величин оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. При сравнении двух выборок использовали критерии Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. Для сравнения данных между группами использовали метод множественных сравнений по Бонферрони и Шеффе, метод Краскелла-Уоллиса для множественного сравнения медиан.

Результаты и обсуждение

Установлено, что ресвератрол содержится лишь в сравнительно небольшом количестве растительных источников, доступных в Республике Беларусь. Среди пищевого сырья к ним относится кожура ягод винограда красных сортов (Рис. 3) и, в меньшей степени, ягоды черники. Нами не был обнаружен ресвератрол в экстрактах из клюквы, малины, брусники, других ягод, соевых бобах, другом пищевом сырье, хотя на это указывают некоторые литературные источники. В исследованных образцах винограда белорусского происхождения (промышленный сорт Альфа) содержание ресвератрола в целом невелико (~0,5 мкг/мл экстракта).

В этанольном экстракте чемерицы (Рис. 4) удалось обнаружить не менее 2 фракций,

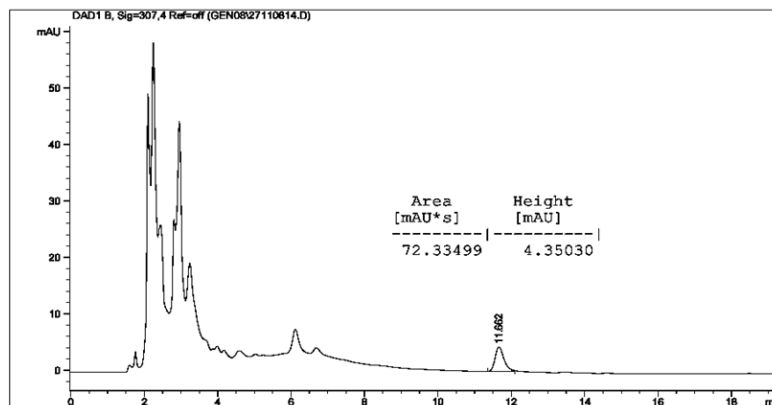


Рис. 3. ВЭЖХ-определение этанольного экстракта кожуры красного винограда

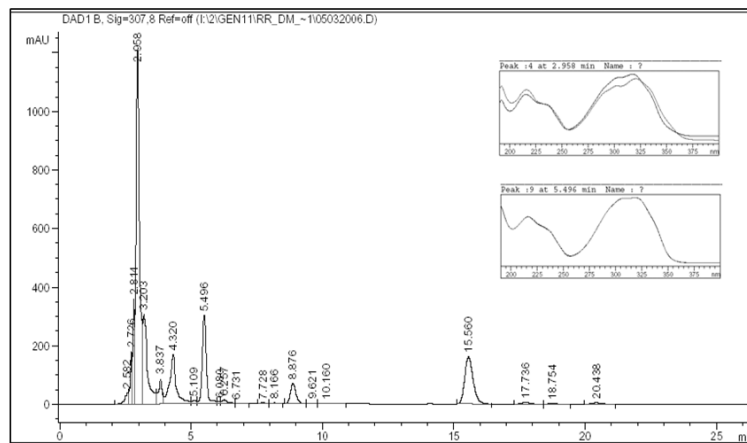


Рис. 4. ВЭЖХ-определение этанольного экстракта корня чемерицы

Примечание. Указаны спектры пиков 4 и 9, соответствующие ресвератролу.

спектр которых при 307 нм соответствует стандарту. Тем не менее, положение пиков на хроматограмме с коротким временем выхода фракций указывает на то, что они, скорее всего, представляют собой конъюгированные соединения ресвератрола.

С учетом токсичности чемерицы как потенциального растительного сырья, нами был проведен хроматографический анализ на ресвератрол других растений, и в частности – различных видов горцев из рода *Polygonum*.

Среди нескольких видов горцев, встречающихся на территории Республики Беларусь, к лекарственным растениям отнесены горец птичий и горец перечный. Однако в извлечениях из этих видов растений, равно как из горца почечуйного и змеиноного, ресвератрол не обнаруживался.

Повышенное содержание ресвератрола было выявлено в этанольных экстрактах из корня горца татарского. В отдельных образцах доля гликозилированного соединения составляла 10% и более. Обычное содержание ресвератрола в спиртовых извлечениях из корня горца татарского находилось в пределах 2-5% (Рис. 5).

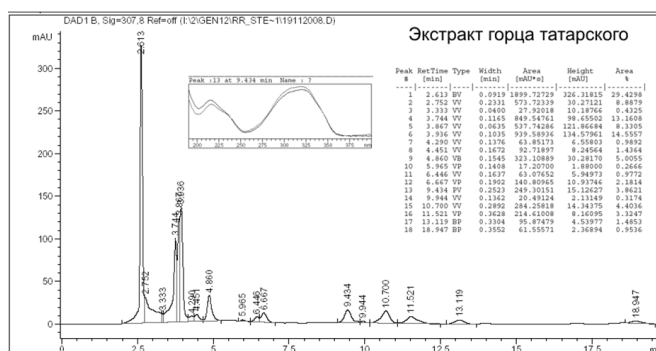


Рис. 5. ВЭЖХ-определение образца горца татарского

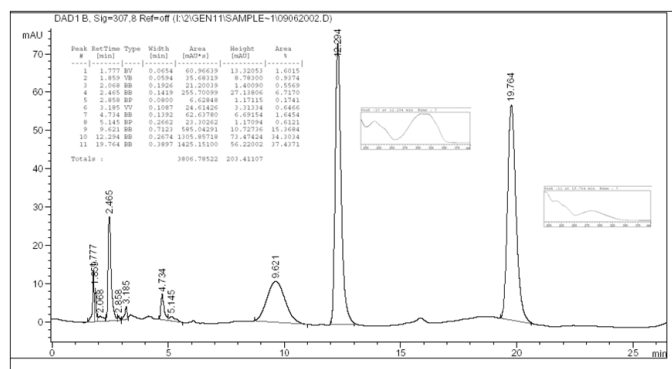


Рис. 6. Элюция ресвератрол-содержащих фракций с октил-агарозы 32% этанолом (ВЭЖХ-определение)

Примечание. Указаны спектры пиков 10 и 11, соответствующие ресвератролу и его цис-изомеру пизеиду.

Дальнейшее обогащение экстрактов по ресвератролу при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ на октил-агарозе (С8-агарозе) привело к увеличению содержания ресвератрола в 10 раз по сравнению с исходным количеством (Рис. 6). Меньший уровень обогащения достигался при использовании обращенно-фазовых матриц на основе силикагеля – Диасорба С16 и С8. В последнем случае наблюдалось трехкратное увеличение концентрации фитоалексина.

Тем не менее, последний вариант хроматографии сохраняет свою значимость при больших объемах концентрирования сырья, так как С8-матрица силикагеля является жесткой и при этом хорошо регенерируется 96% этанолом (в отличие от С16-силикагеля и мягкой матрицы октил-агарозы).

Разработанные методики позволили получить растительные извлечения, обогащенные по ресвератролу, и оценить их антимикробные свойства. Одновременно была проведена оценка этих свойств в экстракте отечественной биодобавки ресвератрола «Кардивитол».

Для определения минимальной подавляющей концентрации (или МПК) ресвератрола в

отношении изучаемых тест-штаммов использовали этанольный экстракт из биодобавки «Кардивитол» в концентрации 400 мкг/мл. Для поддержания ресвератрола в солюбилизированном состоянии в реакцию вносили ДМСО до концентрации 10%.

После инкубации для тест-штамма *Bacillus subtilis* МПК ресвератрола составила 100 мкг/мл (см. Рис. 7). Аналогичный уровень МПК был установлен и для культуры *Candida albicans*. Для всех остальных тест-культур величина МПК превышала 100 мкг/мл.

При оценке антимикробного действия первичных этанольных экстрактов из различных видов растений, содержащих ресвератрол, отмечалось угнетение роста представителей группы грамотрицательных микроорганизмов, включая *P. aeruginosa* и *E. coli* (на 2 разведения в сравнении с антибактериальной активностью растворителя). Также наблюдалось снижение ростовой активности культуры *C. albicans*. Антимикробного действия в отношении *S. aureus* не наблюдалось.

Аналогичным образом выполняли оценку антимикробной активности хроматографических фракций, полученных из первичных этанольных экстрактов. В частности, определяли активность исходного извлечения из горца татарского и его хроматографической фракции после элюции 32% этанолом. В условиях проведенного эксперимента даже при максимальных концентрациях полного ингибирования роста культур обнаружено не было. Как и в исходных экспериментах, ресвератрольные фракции подавляли рост культуры *C. albicans*, *P. aeruginosa* и частично *B. subtilis*.

Следует отметить, что сам исходный экстракт из горца татарского обладал более выраженной антимикробной активностью в отношении тест-штаммов в сравнении с его фракцией. Это может указывать на наличие в его со-

ставе других, пока еще не идентифицированных дополнительных компонентов с антимикробным действием.

Исходя из полученных нами данных, антимикробная активность ресвератрола является достаточно умеренной. Соединение может ингибировать рост некоторых видов микроорганизмов, среди них могут быть и клинически значимые, такие как *P. aeruginosa*, представители рода *Bacillus* и грибы *C. albicans*. Однако МПК для данных возбудителей была равной или превышала 100 мкг/мл. Следует отметить, что высокие МПК >100 мкг/мл в целом характерны для многих лекарственных растений или их извлечений. Такие средства могут применяться для лечения инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами бактерий. В свою очередь, в дальнейших исследованиях ресвератрола представляет интерес оценка его потенциально-го противовирусного действия.

Анализ влияния ресвератрола на абзимную активность иммуноглобулинов установил следующее: при исследовании протеолитической (БАПНА-амидазной) активности обнаружено, 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 иммуноглобулины или иммуноглобулины+ресвератрол. Это свидетельствует в пользу того, что ресвератрол в целом мало влияет на протеолитическую активность IgG, и ускорение распада субстрата связано с аддитивным влиянием ресвератрола на гидролиз БАПНА в присутствии иммуноглобулинов.

Весьма выраженным влиянием ресвератрол обладал на абзимы с пероксидазным действием. В условиях эксперимента происходило полное ингибирование пероксидазных IgG. Такой ре-

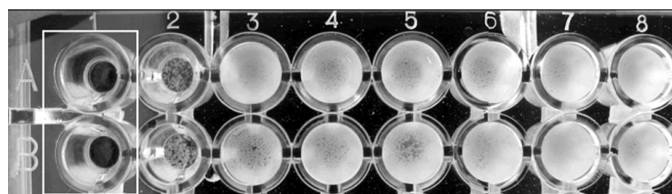


Рис. 7. Определение МПК ресвератрола для тест-штамма *Bacillus subtilis*

зультат в целом не является неожиданным и подтверждает 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. Наличие у ресвератрола собственной ДНКазной активности, возможно, отражает еще один дополнительный механизм участия ресвератрола в клеточной регуляции, включая процессы апоптоза.

Достаточно неожиданные результаты были получены при анализе влияния 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 ДНКазной реакции. При этом в 2-х из них изначально активность отсутствовала (индукция абзимной активности).

В доступной нам литературе мы не обнаружили сведений об активации абзимных функ-

ций в исходно каталитически инертных образцах IgG. Так как сам ресвератрол подобного действия не проявлял, вероятнее всего, индукция абзимной активности связана с влиянием пока не идентифицированных компонентов и соединений. Нельзя исключить, что подобный феномен может иметь определенное значение в патогенезе иммуновоспалительных заболеваний, поскольку ДНКазные абзимные антитела являются маркерами аутоиммунных болезней [19], а их происхождение до сих пор не известно. Последнее предположение, безусловно, требует тщательной проверки и проведения дальнейших исследований.

Анализ действия 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 (см. Таблицу).

В частности, этанол в дозозависимой манере подавлял бласттрансформацию лимфоцитов, индуцированную ФГА. Из этих же данных следует, что 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 лим-

Таблица. Действие ресвератрола и различных концентраций этанола на митоген-активированную пролиферацию лимфоцитов и фагоцитоз (M±sd)

Действующий фактор	Этанол, 0,01%	Этанол, 0,05%	Этанол, 0,2%	Этанол, 0,5%	Контроль стимуляции	Ресвератрол	Контроль без стимуляции
РБТЛ, стимулированная ФГА							
Бластные клетки, %	49,5±0,7	40,9±0,1	23,4±0,6	24,9±0,1	63,4±3,4 (активация ФГА)	7,7±0,1	4,85±0,1 (спонтанная РБТЛ)
РБТЛ, стимулированная ЛПС							
Бластные клетки, %	–	–	–	–	21,4±0,8 (активация ЛПС)	5,9±0,1	
Фагоцитарный индекс лейкоцитов							
Фагоцитарный индекс, %	–	45±2,8	30±1,4	37,5±0,7	67,5±3,53 (активация <i>S. aureus</i>)	49,5±2,1	–

Примечание. Конечная концентрация ресвератрола при оценке пролиферативной активности лимфоцитов составляла $0,5 \cdot 10^{-5}$ М, фагоцитарной активности лейкоцитов – $3,5 \cdot 10^{-5}$ М.

фоцитов, 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 blast-трансформацию 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 оценке 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 данные соответствуют результатам недавней отечественной работы [20], где показано ингибирующее действие ресвератрола на генерацию активных форм кислорода макрофагами.

Эти результаты, а также данные ряда других авторов [7, 13, 14] подтверждают, что ресвератрол и этанол действительно проявляют супрессивное действие в отношении клеток иммунной системы.

Выбранная нами экспериментальная модель представляется адекватной, так как оценивает конечные параметры, характеризующие функцию системы иммунитета: пролиферативный ответ лимфоцитов и интенсивность фагоцитоза. При этом в системе присутствуют основные сывороточные белки – кофакторы данных процессов.

Проводимые до сих пор исследования не разделяли иммуномодулирующую активность ресвератрола и сопровождающих его растворителей: этанола или ДМСО [7, 13, 14]. В них лишь указывается, что в используемых концентрациях они не влияют на клетки системы иммунитета. Однако в работах, непосредственно изучавших их иммуностропное действие, показано, что ДМСО [20] и этанол [15, 22, 23] подавляют функцию лейкоцитов. Кроме того, согласно нашим предварительным данным обнаружен выраженный цитотоксический эффект спиртового раствора ресвератрола, что препятствует оценке его иммуномодулирующей активности.

В настоящем исследовании нам удалось показать, что как ресвератрол, так и этанол обладают самостоятельным иммуносупрессивным действием. При этом ресвератрол был активен в концентрации порядка 10^{-5} М. С одной стороны, это соответствует его содержанию в природных источниках, с другой – данный уровень достижим в сыворотке при пероральном приеме ресвератрол-содержащих препаратов и биодобавок. Это свидетельствует в пользу значимого клинического эффекта ресвератрола и его комбинаций с другими соединениями.

Сходным образом этанол проявлял свое действие во всех конечных концентрациях – от 0,01% до 0,5%, соответственно. Следует отметить, что они отражают весь возможный патофизиологический диапазон содержания этанола в крови человека – от нормы (до 0,3 промилле, [24]) до смертельной дозы в 3-5‰. При этом наблюдается его дозозависимый иммуносупрессивный эффект как в отношении пролиферации лимфоцитов, так и в особенности – фагоцитоза.

Тем самым появляется возможность для объяснения иммуностропного действия этанола. Низкие концентрации этилового спирта обладают умеренным противовоспалительным действием, которое могут сопровождаться благоприятными физиологическими эффектами (противосклеротическим, антипролиферативным и др.) Высокие же концентрации этанола определяют развитие вторичного клеточного иммунодефицита. Это подтверждается клиническими и экспериментальными данными, указывающими на повышенную частоту развития и ухудшение прогноза бактериальных инфекций у лиц с острой и хронической алкогольной интоксикацией [15, 23].

Основным механизмом, определяющим действие этанола на клетки, считается его способность к дестабилизации клеточных мембран [23].

Возможные же механизмы иммуносупрессивного действия ресвератрола гораздо более разнообразны. Описаны многочисленные молекулярные мишени для ресвератрола. Как уже упоминалось, его противовоспалительное действие может быть связано с подавлением активности фактора транскрипции NF- κ B и контролируемых с его помощью провоспалительных цитокинов [3, 4].

Также не исключается прямое подавление ресвератролом ферментов дыхательного взрыва в фагоцитах. Наконец, его антипролиферативный эффект может быть обусловлен влиянием на транскрипцию ДНК через ингибирование белков семейства сиртуинов (гистоновых

деацетилаз) с активацией процессов клеточной аутофагии [25]. С учетом обнаруженного цитотоксического действия ресвератрола появляются дополнительные подтверждения для обоснованности его назначения при опухолевом росте.

С учетом вышеизложенного, совместное применение ресвератрола и этанола может производить аддитивный противовоспалительный и/или иммуносупрессивный эффект. Очевидно, что такое предположение требует проведения дополнительных исследований с применением различных доз и способов введения данных соединений.

После завершения многочисленных клинических испытаний [2], ресвератрол, его модифицированные производные [6] или их комбинации с другими средствами могут оказаться достаточно эффективными в профилактике и терапии целого ряда заболеваний, включая аутоиммунную и иммуновоспалительную патологию. Предметом дальнейшего углубленного изучения становятся молекулярные механизмы иммуотропного действия ресвератрола.

Выводы

1. Повышенное содержание ресвератрола определяется в кожуре различных сортов красного винограда и корнях горца татарского, что делает данные виды растений перспективными

ми в качестве сырья для последующего получения ресвератрола.

2. Установлены оптимальные условия для хроматографического разделения ресвератрол-содержащих растительных фракций (обращенно-фазовая хроматография на С8- или С16-матрицах со ступенчатой элюцией этанолом).
3. Высокие концентрации ресвератрола и ресвератрол-содержащих экстрактов, полученные из растительных источников местного происхождения, способны ингибировать рост тест-штаммов некоторых грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *P. aeruginosa*), а также представителей рода *Bacillus* и грибов кандид.
4. 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.
5. Действие ресвератрола на абзимную функцию поликлональных иммуноглобулинов имеет разнонаправленный характер: ресвератрол полностью подавляет пероксидазную активность IgG, умеренно активирует их протеолитическое действие и лишь незначительно влияет на нуклеазную абзимную активность.

Литература

1. D.K. Das, N. Maulik. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol. Intervent.* 2006; Vol.6, N1: 36-47.
2. А.М. Моисеева, Н.В. Железняк, А.Г. Генералова, Д.В. Моисеев. Фитоалексин ресвератрол: методы определения, механизмы действия, перспективы клинического применения. *Вестник фармации* 2012; № 1 (55): 63-73.
3. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation* 2007; Vol. 30, N1-2: 1-6.
4. Iyori M, Kataoka H, Shamsul HM et al. Resveratrol modulates phagocytosis of bacteria through an NF- κ B-dependent gene program. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008; Vol.52, N1: 121-127.
5. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 1995; № 235: 207-219.
6. Dróbková K, Pereko T, Nosková R, Harmatha J, Smidrkal J, Janinová V. Polyphenol derivatives – potential regulators of neutrophil activity. *Interdiscip. Toxicol* 2012; Vol.5, N2: 65-70.
7. Boscolo P, del Signore A, Sabbioni E et al. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. *Ann. Clin. Lab. Sci* 2003; Vol.33: 226-231.
8. G.B. Mahady, S.L. Pendland, L.R. Chadwick. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am. J. Gastroenterol.* 2003; № 98: 1440-1441.
9. Chan M.M-Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem.Pharmacol* 2002; №63: 99-104.
10. Wang WB, Lai HC, Hsueh PR, Chiou RY, Lin SB, Liaw SJ. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *Journal of Medical Microbiology* 2006; № 55: 1313-1321.
11. Docherty JJ, Fu MM, Tsai M. Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrob. Chemother* 2001; №47: 243-244.
12. Wang, L.X. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J. Pharm. Sci.* 2004; № 10: 2448-2457.
13. Cavallaro A, Ainis T, Bottari C, Fimiani V. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiol. Res.* 2003; Vol.52: 555-562.
14. Cavallaro A, Ainis T, Bottari C, Fimiani V. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Brit. J. Pharmacol.* 1998; Vol.123: 1691-1699.

15. Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol. Alcoholism*. 1999 Vol.34, N6: 830–841.
16. Семина Н.А., Сидоренко С.В., Резван С.П. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* 2004; Т.6, №4: 306–359.
17. Кундер Е.В., Волкова М.В., Генералов И.И., Невинский Г.А. Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость дезоксирибонуклеазной активности поликлональных IgG и сыворотки крови при спондилоартритах. *Медицинская иммунология* 2012; Vol.14, №4-5: 337–346.
18. Горячковский М.А. Справочное пособие по клинической биохимии. Одесса: ОКФА. 1994. 225–228.
19. Colafrancesco S., Agmon-Levin N., Perricone C., Shoenfeld Y. Unraveling the soul of autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and treatment adding dowels to the puzzle. *Immunol. Res.* 2013; Vol.56: 200–205.
20. Бизунок Н. А., Дубовик Б. В., Шадыро О. И., Гапанькова С. Н., Бизунок Т. А. Действие ресвератрола, производных бензойной и коричной кислот на генерацию активных форм кислорода в макрофагах. *Вестн НАНБ, сер. мед наук* 2012; №1: 48–53.
21. Klooverpris H, Fomsgaard A, Handley A, Ackland J, Sullivan M, Goulder P. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following co-incubation for more than two hours. *J. Immunol. Meth.* 2010; Vol. 356, N1-2: 70–78.
22. Pruett SB, Fan R, Cheng B, Glover M, Tan W, Deng X. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. *Toxicol. Sciences* 2010; Vol.117, N2: 314–324.
23. J. Goral, J. Karavitis, E.J. Kovacs. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol* 2008; Vol.42, N4: 237–247.
24. Постановление Совета Министров Республики Беларусь 14 апреля 2011 г. № 497 «Об утверждении Положения о порядке проведения освидетельствования физических лиц на предмет выявления состояния алкогольного опьянения и (или) состояния, вызванного потреблением наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ».
25. Morselli E, Maiuri MC, Markaki M et al. The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy. *Autophagy* 2010; Vol.6, N1: 186–188.

Сведения об авторах

- Коротина Ольга Львовна – аспирант кафедры клинической микробиологии ВГМУ; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, scider@mail.ru, 8-0212-37-06-12.
Зубарева Ирина Валерьевна – доцент кафедры клинической микробиологии ВГМУ; канд. мед. наук 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, scider@mail.ru, 8-0212-37-06-12.
Юпатов Юрий Геннадьевич – врач-интерн ГУЗ ВГЦП Филиал № 3 Поликлиника № 4 им. В.И. Ленина; 210015, г. Витебск, ул. Б. Хмельницкого, 27, yury.yupatov@gmail.com, 8-0212-36-70-64
Моисеев Дмитрий Владимирович – зав. кафедрой стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК ВГМУ, канд. фарм. наук, доцент; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, ussr80@yandex.ru, 8-0212-25-82-41
Генералов Игорь Иванович – зав. кафедрой клинической микробиологии ВГМУ, д-р. мед. наук, профессор; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, g2@tut.by, 8-0212-37-06-12

Поступила 22.08.2013 г.