

© Калинкина О.В., Сычев И.А. 2014
УДК 615.322:547.458].015.4

ДЕЙСТВИЕ ПОЛИСАХАРИДА КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ НА ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ ЖИВОТНЫХ, ПРОЦЕССЫ ФАГОЦИТОЗА И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

О.В. Калинкина, И.А. Сычев

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

Из травы крапивы двудомной выделен полисахаридный комплекс, установлен качественный и количественный моносахаридный состав, изучено его влияние на физическую работоспособность, процессы фагоцитоза, осмотическую, термическую и перекисную резистентность мембран эритроцитов.

Ключевые слова: полисахарид, моносахарид, крапива двудомная, фагоцитоз, резистентность.

Поиск препаратов растительного происхождения, стимулирующих физиологические функции организма, является приоритетным направлением научных исследований.

Природные полисахариды растительного происхождения при попадании в организм здорового животного оказывают стимулирующее воздействие на иммунную систему, активируют ферментные системы клеток, усиливая синтетические и защитные функции организма, повышают количество эритроцитов и гемоглобина в крови за счет активации гемопоэза [3].

Повышение синтетической активности тканей и органов, а также усиление притока кислорода способствует повышению уровня обмена веществ и как следствие приводит к повышению физической работоспособности организма.

Целью работы явилось изучение качественного и количественного состава полисахаридного комплекса крапивы двудомной и его влияние на физическую работоспособность, процессы фагоцитоза и резистентность мембран эритроцитов.

Материалы и методы

Из предварительно очищенного 80% раствором этанола воздушно-сухого сырья 1,5 часовой водной экстракцией на

кипящей водяной бане выделяли водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПК). Пектиновые вещества извлекали из шрота, оставшегося после получения ВРПК 1% раствором щавелевокислого аммония в соотношении 1:10 на водяной бане при температуре 80⁰ С в течение 1 часа и повторяли три раза для полного выделения пектинов. Полисахариды осаждали избытком 96% этанола. Осадки полисахаридов промывали несколько раз 96% этанолом, ацетоном, эфиром, очищали диализом и пересаживали [2].

Качественный и количественный моносахаридный состав полисахаридов определяли после 9-часового гидролиза 1 н. серной кислотой. Идентификацию моносахаридов проводили методом нисходящей бумажной хроматографии в системе бутанол-1-уксусная кислота-вода (4:1:5). Нейтральные сахара проявляли анилинфталатом. Количество урановых кислот определяли комплексонометрическим методом [1].

Удельную вязкость водного раствора полисахаридного комплекса крапивы двудомной определяли вискозиметрическим методом на вискозиметре Оствальда с диаметром капилляра 0,54 мм. Значение характеристической вязкости было опре-

делено графическим методом. Константы для полисахаридов были установлены нами, исходя из имеющихся в литературе данных по определению средней молярной массы амилозы разных сортов риса вискозиметрическим методом [9].

pH водных растворов полисахарида определяли при помощи лабораторного pH – метра pH -150МИ.

Изучение влияния полисахаридного комплекса на физическую работоспособность выполняли на 40 крысах-самках линии Wistar массой 200-250 грамм, содержащихся в стандартных условиях вивария.

Полисахаридный комплекс для биологических исследований растворяли в физиологическом растворе, получали 5% раствор.

Для изучения влияния полисахарида на физическую работоспособность и на изменение массы тела животных препарат вводили животным 1 раз в сутки в дозе 0,1 г/кг массы тела животных *per os* в течение 25 дней (n=20). Контрольные животные получали в те же сроки равный объем физиологического раствора (n=20).

Исследование физической работоспособности проводили на 1,5,10,15,20,25 сутки введения препарата и на 7 день отмены для оценки последствия. В эти же сроки определяли массу тела животных. Физическую работоспособность крыс оценивали при помощи экспериментальной модели плавания. Для этого к задней лапке животного привязывали груз массой 10% от массы тела животного. Животное с грузом помещали в стеклянный цилиндр диаметром 18 см с высотой водного столба 40 см (температура воды поддерживалась в пределах 29-30°C) и отмечали время плавания животного на поверхности воды [4,6].

Исследования действия полисахаридов на фагоцитоз и резистентность мембран эритроцитов проводили *in vitro* с кровью здоровых доноров. Для этого к десяти миллилитрам крови добавляли 0,025 мл 5% раствора полисахарида, приготовленного на физиологическом растворе, а в контрольные пробирки с кровью – равный объем физиологического раствора. Все пробы выдерживали в тер-

мостате при 37°C в течение 1,5 часов, затем добавляли культуру бифидобактерий и выдерживали в термостате при той же температуре еще 1,5 часа. По окончании термостатирования готовили мазки, которые фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзе, и считали процент фагоцитированных клеток – показатель фагоцитарной активности и среднее количество микробов в каждой клетке с учетом всех опытов – фагоцитарное число. Определяли количество микробных тел, подвергшихся разрушению в одном фагоците – индекс завершенности фагоцитоза [7].

Для исследования влияния полисахарида крапивы на осмотическую резистентность мембран эритроцитов готовили 0,9% раствор хлорида натрия на фосфатном буфере с pH 7,4, из которого составляли серию разведений с концентрациями 0,85; 0,75; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40%. Ко всем растворам добавляли по 0,1 мл крови здорового донора в контрольных образцах и по 0,1 мл крови с полисахаридом в дозе $1 \cdot 10^{-4}$ в опытных. Все пробы выдерживали 30 мин при 37°C в термостате, а затем определяли степень гемолиза на фотозлектроколориметре КФК-2 при длине волны 500 нм и светофильтре №5 [8].

Для изучения действия полисахарида на перекисную резистентность мембран эритроцитов в опытные пробы с 5 мл физиологического раствора на фосфатном буфере добавляли по 0,1 мл крови с полисахаридом в дозе $1 \cdot 10^{-4}$, а в контрольные – по 0,1 мл крови без полисахарида. Все пробы выдерживали в термостате 30 мин, а затем в каждую вносили 3,75% раствор пероксида водорода. Степень гемолиза определяли на фотозлектроколориметре КФК-2 при длине волны 500 нм и светофильтре №5 [8].

Для определения термической резистентности пробы крови с полисахаридом и контрольные помещали в термостат и нагревали до температур 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 64°C. При достижении каждой температуры пробирки выдерживали 3-5 минут, центрифугировали и степень гемолиза определяли как указано выше [8].

Полученные экспериментальные данные были подвергнуты математико-статистической обработке с использованием программы Statistica 6.0. Характер распределения данных определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для установления статистически достоверных межгрупповых различий применяли критерий Манна – Уитни [5]. Достоверными считали различия при значении $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Суммарный выход полисахарида, полученного из стандартизованного воздушно-сухого сырья крапивы двудомной по описанной выше методике, соста-

вил 12%. Полисахарид, впервые выделенный нами, представляет собой аморфное вещество светло-серого цвета, без специфического запаха, хорошо растворимое в воде и физиологическом растворе.

Методом кислотного гидролиза в сочетании с бумажной хроматографией был установлен качественный и количественный состав нейтральных моносахаридов полисахарида травы крапивы двудомной и общее количество уроновых кислот. Большое количество уроновых кислот в составе полисахарида дает возможность отнести его к классу пектинов. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Моносахаридный состав полисахаридов травы крапивы двудомной (в %)

Название растения	уроновые кислоты	глюкоза	галактоза	арабиноза	ксилоза	рамноза
Крапива двудомная	84,6	31,9	22,1	28,1	4,6	15,3

pH 5% водных растворов полученных полисахаридов находится в пределах 4,68-4,72.

Значение средней молярной массы полисахаридов, полученное вискозиметрическим методом, составило $6,4 \cdot 10^3$, что приблизительно соответствует среднему массовому значению.

Введение крысам полисахаридного комплекса приводило к изменениям общего состояния животных. У них повышался аппетит, улучшался внешний вид, лоснилась шерсть, животные становились более спокойными.

Под влиянием введения полисахарида увеличивалось время плавания животных по сравнению с контролем, что происходило на протяжении всего времени эксперимента.

При введении полисахарида в течение 5 дней время плавания подопытных животных увеличивается незначительно.

На 10 сутки введения полисахарида время плавания подопытных крыс максимально превосходит время плавания контрольных животных на 20,6% ($p < 0,05$).

К 15 суткам эксперимента происходит снижение физической работоспособности экспериментальных животных. На 20 и 25 сутки опыта физическая работоспособность контрольных и опытных животных практически не отличались друг от друга. По окончании срока последствия препарата (7 суток) физическая работоспособность возрастает как у контрольных – на 18,6% ($p < 0,05$), так и у подопытных крыс – на 28,7% ($p < 0,05$) (рис. 1).

Введение полисахарида способствует нарастанию массы тела подопытных животных в течение всего времени проведения эксперимента.

Максимальный прирост массы тела подопытных животных наблюдался на 25 сутки эксперимента и составил 11,3% ($p < 0,05$). Прирост массы тела контрольных крыс к этому времени – 6,3% ($p < 0,05$).

С момента прекращения введения препарата подопытным животным за время последствия (7 суток) масса тела не изменялась и оставалась на прежнем уровне, незначительно превосходя массу контрольных крыс (рис. 2).

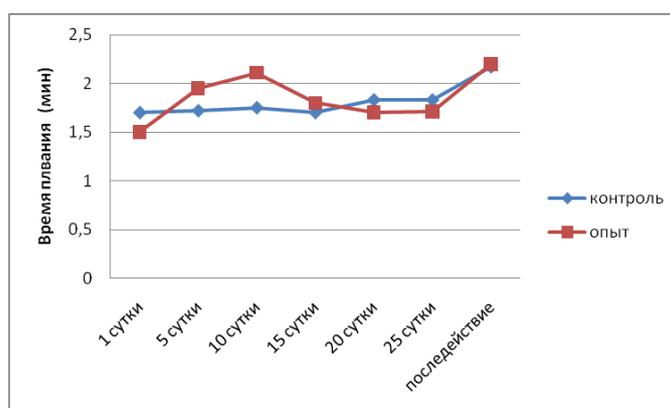


Рис. 1. Влияние ВРПК на физическую работоспособность

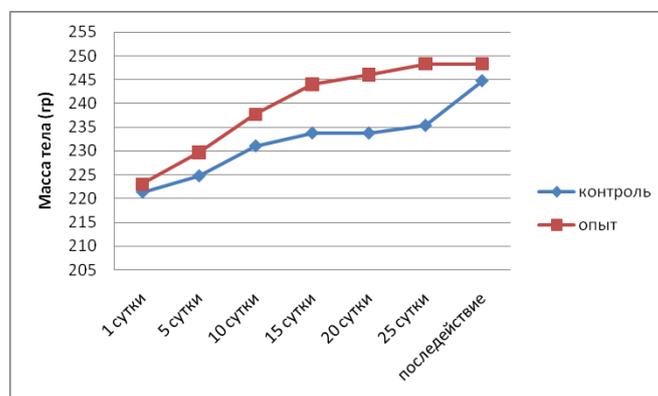


Рис. 2. Изменение массы тела при приеме ВРПК в дозе 0,1г/кг массы тела

Под действием полисахарида процент фагоцитоза повышался незначительно, а фагоцитарное число увеличилось на 21% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации процесса фагоцитоза и увеличении поглощенных микробных

тел одним фагоцитом. Незначительно повышался индекс завершенности фагоцитоза по отношению к контролю, что, скорее всего, связано с небольшой активацией ферментных систем фагоцитов. Результаты эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние полисахаридов травы крапивы двудомной на процессы фагоцитоза

Препарат	% Фагоцитоза		Фагоцитарное число		Фагоцитарный индекс	
	контроль (n=6)	опыт (n=6)	контроль (n=6)	опыт (n=6)	контроль (n=6)	опыт (n=6)
ВРПК крапивы двудомной	60,3	66,1	3,8±0,19	4,5* (4,1;5,1)	1,09 (1,05;1,10)	1,12 (1,11;1,15)

Примечание: здесь и далее * – статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Добавление раствора полисахарида крапивы двудомной объемом 0,025 мл к 10 мл крови здорового донора приводило к снижению процента гемолизированных клеток в опытных пробах по сравнению с контрольными. Особенно значительно снижается количество разрушенных клеток при температурах 58⁰С и 60⁰С, когда

процент гемолиза в опытных пробах в 3,4 и в 2,74 раза ($p < 0,05$) соответственно ниже, чем в контроле. При 62⁰С процент гемолиза в пробах с полисахаридом в 1,3 раза ($p < 0,05$) ниже, чем в контроле, а при 64⁰С гемолиз и в контроле, и в опыте практически достигает 100%. Все данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Термическая резистентность эритроцитов

№	Вариант опыта	Температура термостата, 0С						
		Количество гемолизированных эритроцитов % (n=6)						
		52	54	56	58	60	62	64
1	опыт	1,5	2,5	3,2	7,9*	29,4*	68,1*	96,1
2	контроль	2,4	3,6	4,5	27,1	80,6	91,2	99,7

Изучение влияния полисахарида крапивы на осмотическую резистентность мембран эритроцитов показало, что в опытных пробах количество гемолизированных клеток меньше, чем в контрольных образцах. В растворах с концентрацией хлорида натрия 0,5% и 0,45% про-

цент гемолиза в опытных образцах снижается на 15,8% ($p < 0,05$) и 19,3% ($p < 0,05$) соответственно.

В растворах с концентрацией хлорида натрия 0,4% наблюдается практически полный гемолиз как в контроле, так и в опыте (табл. 4).

Таблица 4

Осмотическая резистентность эритроцитов

	Концентрация физиологического раствора NaCl (%)							
	0,85	0,75	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40
	Количество гемолизированных эритроцитов % (n=6)							
опыт	2,8	3,5	4,0	4,6	5,0	52,1*	62,1*	96,1
контроль	3,6	4,3	4,8	5,4	6,0	67,9	81,4	100

Добавление полисахарида к крови здорового донора показало, что препарат защищает мембраны эритроцитов от процесса перекисного окисления липидов. Процесс гемолиза уменьшается в 3,5 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Выводы

1. Из травы крапивы двудомной впервые выделен полисахарид, относящийся к классу пектинов.
2. Введение полисахарида достоверно увеличивает физическую работоспособность подопытных животных по сравнению с контролем на 10 суток эксперимента.
3. Введение полисахарида крапивы двудомной повышает массу эксперимен-

тальных животных на 25 суток эксперимента по сравнению с контролем.

4. Добавление полисахарида к крови здорового донора приводит к повышению фагоцитарного числа лейкоцитов по отношению к контролю.

5. Введение полисахарида крапивы двудомной повышает термическую, осмотическую и перекисную резистентность мембран эритроцитов донорской крови.

Литература

1. Зайцева Г.Н. Количественное определение углеводов методом нисходящей хроматографии на бумаге / Г.Н. Зайцева, Т.И. Афанасьева // Биохимия. – 1957. – Т. 22, вып. 6. – С. 1035-1042.

2. Кочетков Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков. – М.: Изд-во «Химия», 1967. – 672 с.
3. Лаксаева Е.А. Влияние полисахарида ирги обыкновенной на резистентность мембран эритроцитов / Е.А. Лаксаева, И.А. Сычев // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №1. – С. 65-68.
4. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине / В.Н. Каркищенко [и др.] // Биомедицина. – 2012. – №4. – С. 15-21.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2002. – 312 с.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. – 358 с.
7. Сычев И.А. Фагоцитозстимулирующее действие полисахарида донника желтого / И.А. Сычев, В.М. Смирнов, Т.Ю. Колосова // Биохимия на рубеже XXI века: межрегиональный сборник научных трудов. – Рязань: РязГМУ, 2000. – С. 505-509.
8. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии / Й. Тодоров; под ред. Г.Г. Газенко. – 4-е русское издание. – София: Государственное издание «Медицина и физкультура», 1963. – С. 313-319.
9. Philips A.T. An investigation of varietal differences in the iodine – binding capacities of crystalline rice amylases / A.T. Philips, V.R. Williams // I. Food. Sci. – 1961. – Vol. 26. – P. 573-576.

THE INFLUENCE OF GREAT NETTLE POLYSACCHARIDE ON PHYSICAL ACTIVITY OF ANIMALS, PROCESSES OF PHAGOCYTOSIS AND RESISTANCE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

O.V. Kalinkina, I.A. Sichev

Polysaccharide complex is excreted from great nettle, qualitative and quantitative monosaccharide composition is determined, its influence on physical activity, processes of phagocytosis, osmotic, thermic and peroxide resistance of erythrocyte membranes is studied.

Key words: polysaccharide, monosaccharide, great nettle, phagocytosis, resistance.

Калинкина Оксана Владимировна – ассистент кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.
E-mail: kalinkina.oksanka@mail.ru.

Сычев Игорь Анатольевич – д-р биол. наук, доц., зав. кафедрой общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.