

УДК 633.8:616.155.3-076.5:599.323.45
DOI: 10.25684/0513-1634-2023-147-83-89

ВЛИЯНИЕ НАСТОЯ *ZIZIPHORA BUNGEANA* JUZ. НА ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ ФОРМУЛУ КРОВИ КРЫС С МОДЕЛЮ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Светлана Анатольевна Приходько¹, Дмитрий Юрьевич Кустов²,
Ольга Константиновна Кустова¹, Александр Захарович Глухов¹

¹ФГБНУ «Донецкий ботанический сад»
283003, ДНР, г. Донецк, пр. Ильича, 110

²ГОО ВПО Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького
283003, ДНР, Донецк, пр. Ильича, 16
E-mail: lavanda_dbg@mail.ru¹, physiolog@mail.ru²

Исследовано влияние применения водного настоя лекарственного растительного сырья *Ziziphora bungeana* Juz. на картину белой крови лабораторных крыс. Животные были разделены на 3 равновеликие группы. Первую группу составляли интактные (здоровые) животные. Вторую – контрольные животные с моделью ревматоидного артрита. Третью – опытные животные с моделью ревматоидного артрита, которые в течение 90 дней получали настой *Ziziphora bungeana* Juz. В эксперименте анализировали изменения соотношения лейкоцитов (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и лимфоциты) в разных группах животных. Моделирование ревматоидного артрита приводило к достоверному увеличению уровня лимфоцитов на фоне снижения уровня других форм лейкоцитов. Длительное употребление настоя способствовало нормализации лейкоцитарной формулы крови. Восстанавливался уровень лимфоцитов, повышался уровень эозинофилов и моноцитов. Количество сегментоядерных нейтрофилов превышало значения интактных крыс. Таким образом, настой *Ziziphora bungeana* Juz. показал эффективное действие в коррекции лейкоцитарной формулы крови при ревматоидном артрите.

Ключевые слова: *Ziziphora bungeana* Juz.; ревматоидный артрит; лейкоцитарная формула крови; лабораторные крысы

Введение

Применение в медицине лекарственных препаратов на основе растительного сырья не теряет своей актуальности. Преимуществом их использования являются низкие токсичность, кумулятивность и аллергенность, что дает возможность длительного применения в случаях хронического течения заболеваний. Сохраняется потребность фармацевтической промышленности в разработке эффективных и безопасных лекарственных средств на основе растительного сырья, в особенности отечественного производства, что отчасти позволяет решать вопрос импортозамещения.

Источником разработки и получения новых лекарственных средств являются малоизученные виды растений, растительное сырье которых возможно получать в условиях их естественного произрастания или целенаправленного выращивания с соблюдением требований практики культивирования и сбора лекарственных растений. Таким перспективным растением является зизифора бунге – *Ziziphora bungeana* Juz. (Lamiaceae), которое с давних времен применялась в восточной медицине в качестве кардиологического, гипотензивного, болеутоляющего, успокаивающего и ранозаживляющего средства в виде водного настоя, масляных смесей самостоятельно или в комплексе с другими травами [1, 7].

Современные исследования биохимического состава и токсико-фармакологических свойств растительного сырья, компонентов эфирного масла растений *in vivo* и *in vitro*, а также профиля фармакологической активности и безопасности лекарственных средств на ее основе успешно проводятся в ряде стран [5]. Трава *Z. bungeana* может быть источником флавоноидов, кверцетина, производных

кофейной кислоты, жирных кислот, витаминов, тритерпенов, стеролов и др. [1]. Содержание эфирного масла составляет 0,12-0,98 мл/100 г сырья. Оно богато пулегоном (5,19-57,85%), тимолом (1,4%), содержит лимонен (0,26-12,79%), 1,8-цинеол (до 27,4%), борниловый ацетат (0,47-9,37%), пиперитон (0,70-9,05%), ментол и его производные (14%), карвакрол (52,7%), линалоол (15,9%) [4, 19, 20]. В фитотерапии используют водные настои травы для снижения артериального давления, как седативное, спазмолитическое средство, при неврозах и аритмии сердца.

Широкий спектр биологически активных соединений, опыт применения в народной медицине и возможность культивирования открывают перспективность применения отечественного сырья *Z. bungeana* в качестве сопутствующего лечебно-профилактического средства при терапии патологий, характеризующихся поражением ряда систем организма: иммунной, сердечно-сосудистой, кроветворной, пищеварительной. Несмотря на системное и глубокое изучение, растение не имеет официального статуса как лекарственное средство [5], отсутствуют сведения о возможностях его использования при коррекции аутоиммунных патологий.

Ревматоидный артрит (РА) является одним из самых распространенных системных аутоиммунных заболеваний, ухудшающих качество жизни человека и способствующих ранней инвалидизации. Недостаточно выясненный этиопатогенез заболевания, высокая хронизация и сочетанность с другими аутоиммунными патологиями приводят к продолжительному и неэффективному лечению. Используемые препараты зачастую обладают высокой гепатотоксичностью, имеют высокую стоимость, поэтому приоритетным является поиск способов коррекции заболевания, в частности, средствами на основе растительного сырья. Ранее нами были получены данные о позитивном влиянии на показатели периферической крови у крыс с моделью РА водного настоя лекарственного растительного сырья (ЛРС) *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze, также содержащего в своем составе богатый комплекс биологически активных соединений, в том числе флавоноидов [9].

Исследования по применению ЛРС *Z. bungeana* в лечении данного заболевания ранее не проводились. Однако, учитывая, что флавоноиды из ее травы имеют антиоксидантную, противовоспалительную, противоопухолевую и антибактериальную активность [18], можно предположить положительное влияние настоя растительного сырья на коррекцию иммунной реакции организма при такой аутоиммунной патологии, как РА.

Чувствительным и достаточно простым маркером протекающего в организме воспаления, включая аутоиммунное, является определение лейкоцитарной формулы периферической крови. Реактивность ее изменений может свидетельствовать об эффективности применяемой терапии [22].

Цель настоящего исследования – изучить влияние длительного применения настоя растительного сырья *Ziziphora bungeana* Juz. на лейкоцитарную формулу крови крыс с моделью ревматоидного артрита.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлась надземная часть растений *Ziziphora bungeana* Juz., произрастающих в коллекции ароматических растений Донецкого ботанического сада (ДБС). Успешность интродукции в открытый грунт оценивали по Р.А. Карпионовой [8].

Сбор и заготовку ЛРС проводили в фазе массового цветения (со второй половины июня). Надземную часть (стебли, листья и цветки) срезали вручную на высоте 10-12 см от земли в период 8.00-10.00 часов. Сушку, очистку от посторонних примесей и измельчение проводили в агролаборатории ДБС при температуре окружающей среды

27±5°C. Сырье упаковывали в плотно закрытые картонные коробки и бумажные пакеты, этикетировали с указанием наименования, сроков сбора и массы нетто.

Медико-биологический эксперимент проводили на базе лаборатории теоретической и прикладной нейрофизиологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького (ГОО ВПО ДОННМУ им. М. Горького). Объектами являлись 30 белых лабораторных крыс линии Вистар обоего пола массой 250-300 г. Для проспективного когортного исследования животных разделяли на 3 группы по 10 особей в каждой. Первую группу (И) составляли интактные (здоровые) животные. Вторую (К) – контрольные животные с моделью РА. Третью (О) – опытные животные с моделью РА, которые получали водный настой ЛРС *Z. bungeana*. Всех животных содержали в виварии в условиях фоторежима 12L/12D, постоянной температуры и влажности воздуха при свободном доступе к воде, стандартном рационе питания и соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными [3, 15].

Моделирование РА в группах К и О осуществляли по оригинальной методике [12], основанной на создании смешанного коллаген-индуцированного и адьювантного артритов, позволяющей в короткие сроки сформировать устойчивую выраженную патологию. Для этого животным однократно парентерально вводили суспензию коллагена II типа, а также в разные части тела – полный адьювант Фрейнда и бычий сывороточный альбумин. Формирование проявлений РА наблюдалось с 15-х по 30-е сутки после введения и подтверждалось серопозитивной реакцией на ревматоидный фактор.

Водный настой ЛРС *Z. bungeana* изготавливали из расчета 15-20 г сырья на 1 л закипевшей воды и настаиванием в течение 30 мин. Крысам группы О давали настой в поилках в свободном доступе в течение 90 дней.

Определение лейкоцитарной формулы проводили в последней трети эксперимента (в течение 30 дней) из расчета 3 мазка/крыса общим количеством $n=30$ для каждой группы животных. Кровь брали из хвостовой вены стандартным методом [6]. Мазок крови фиксировали в метаноле и окрашивали азур-эозином по Романовскому-Гимзе, после чего подсчитывали различные формы лейкоцитов (на 100 клеток) при масляной иммерсии под бинокулярным микроскопом при увеличении 1×1000 [13]. В эксперименте регистрировали соотношение различных форм лейкоцитов (палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и лимфоциты) в разных группах животных.

Анализ результатов наблюдений проводили при помощи программ Excel и MedStat [10]. Для обработки данных, полученных в процессе исследования, применялись методы описательной статистики: вычислялось значение среднего арифметического ($\bar{X}$) и стандартного отклонения (σ). Нормальность распределения определялась по W -критерию Шапиро-Уилка. При сравнении двух выборок нормального распределения использовался t -критерий Стьюдента, в остальных случаях – W -критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Ziziphora bungeana (sin. *Ziziphora clinopodioides* Lam., *Ziziphora media* Bunge.) – полукустарничек, высотой 20-30 см, сильно ветвится. Стебли тонкие, многочисленные, одревесневающие у основания, ветвистые, листья мелкие, узколанцетные, жесткие. Соцветие головчатое, состоит из многочисленных розово-фиолетовых цветков. Места естественного обитания – щебнистые горные склоны, в разнотравно-злаковых степях, в полупустынных районах Казахстана, Кыргызстана, Монголии, России, Таджикистана, Туркменистана и Узбекистана [11, 14]. В научных публикациях имеются сведения об успешности интродукции *Z. bungeana*. Сравнительное биохимическое изучение ЛРС

показало, что при культивировании растений содержание биологически активных веществ не уступало сырью, собранному в естественных условиях произрастания [1].

В ДБС *Z. bungeana* проходила интродукционное изучение с 1996 г. Семенной материал был получен по делектусу из трех ботанических садов Германии (г. Лейпциг, 1996 г., регистрационный №163577), Дании (г. Копенгаген, 2000 г., №176898) и РФ (г. Махачкала, 2001 г., №178240). К настоящему времени в коллекции культивируется образец 2001 г. интродукции. Культура перспективна для выращивания в открытом грунте [2]. Оценка успешности интродукции составила – 13 баллов (семеношение ежегодное и обильное, вегетативное размножение слабое, сохраняет природные размеры, степень выживания растений в неблагоприятный период года – растения не погибают). Цветение с первой декады июня до начала июля, созревание семян – в июле – начале августа. Наблюдается единичный самосев.

Для оценки выраженности воспалительного процесса при моделировании РА у лабораторных животных были проанализированы процентные соотношения различных форм лейкоцитов в мазках.

Как видим из рисунка 1, моделирование РА вызывало снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов с $4,7 \pm 1,5\%$ до $2,5 \pm 1,3\%$ ($p < 0,001$). Использование настоя *Z. bungeana* не вызывало значимых изменений данного параметра ($3,0 \pm 1,6\%$), что было достоверно ($p < 0,001$) ниже нормы и не отличалось от группы К ($W=831,0/p=0,195$) (рис. 1).

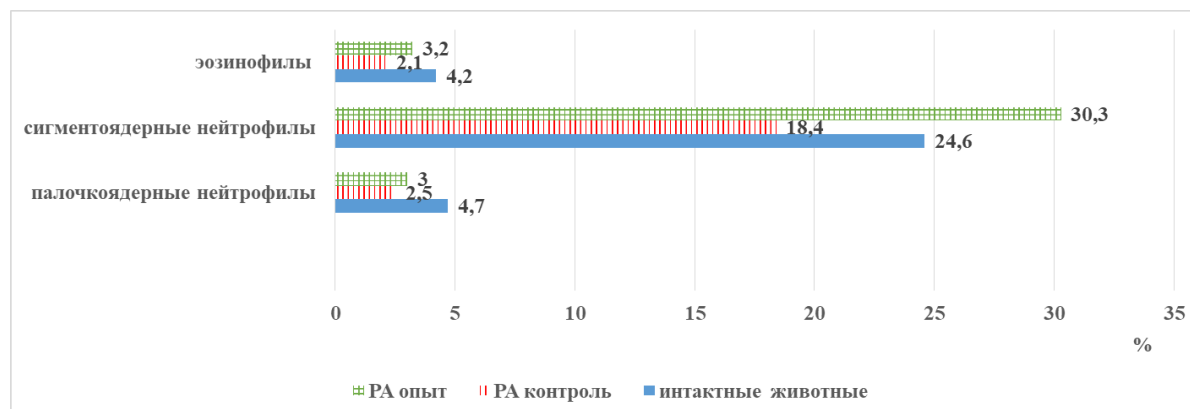


Рис. 1 Изменение уровня нейтрофилов и эозинофилов крови белых крыс с моделью РА до и после длительного применения водного настоя *Ziziphora bungeana* Juz.

Уровень сегментоядерных нейтрофилов снижался в группе К с $24,6 \pm 4,8\%$ до $18,4 \pm 3,3\%$ ($p < 0,001$). В группе животных, которым давали настой *Z. bungeana*, количество сегментоядерных нейтрофилов повышалось до $30,3 \pm 5,3\%$, что существенно превышало значения показателя как интактных, так и контрольных крыс ($p < 0,001$).

Уровень эозинофилов в интактной группе составил $4,2 \pm 1,3\%$. Моделирование РА приводило к их снижению до $2,1 \pm 1,1\%$ ($p < 0,001$), а в опытной группе наблюдалось увеличение до $3,2 \pm 1,1\%$, что было выше, чем в группе контроля ($p < 0,001$), но достоверно ниже выявленной нормы ($W=731,5/p=0,005$) (рис. 1).

Сходная ситуация наблюдалась при сравнении уровня моноцитов в экспериментальных группах (рис. 2): $5,4 \pm 1,8\%$ в группе интактных крыс, достоверное снижение ($p < 0,001$) до $1,9 \pm 1,3\%$ в группе контроля с последующим увеличением ($W=764,0/p=0,022$) до $2,9 \pm 1,9\%$ в группе, которой давали настой *Z. bungeana*. Это, однако, было ниже, чем у интактных особей ($p < 0,001$) (рис. 2).

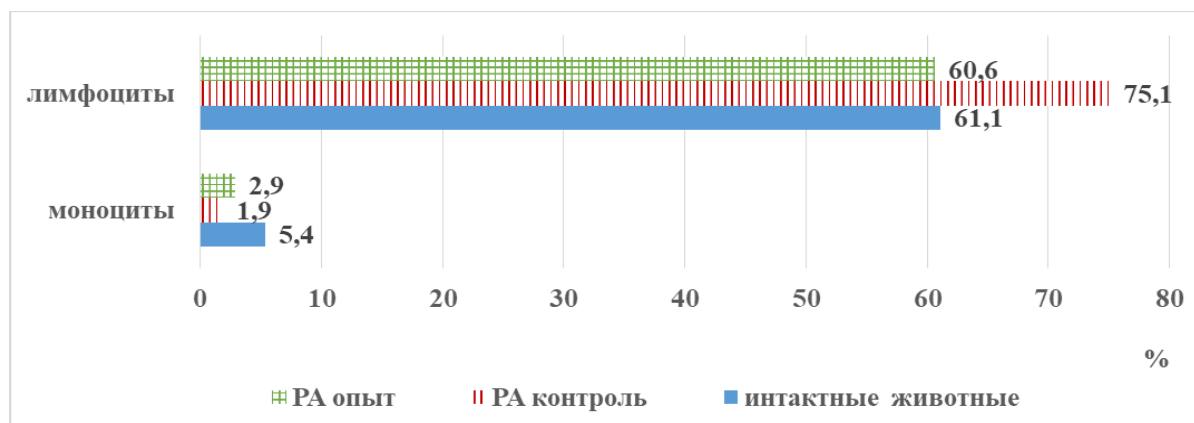


Рис. 2 Изменение уровня лимфоцитов и моноцитов крови белых крыс с моделью РА до и после длительного применения водного настоя *Ziziphora bungeana* Juz.

Количество лимфоцитов в группе крыс с моделью РА возрастало с $61,1 \pm 5,2\%$ до $75,1 \pm 3,8\%$ ($p < 0,001$). После длительного потребления настоя *Z. bungeana* уровень лимфоцитов восстанавливался до исходных значений ($p = 0,654$), составляя $60,6 \pm 3,9\%$, что было достоверно ($p < 0,001$) ниже, чем в группе контроля.

Анализируя один из самых значимых индикаторов воспаления – нейтрофильно-лимфоцитарный индекс, можем видеть, что если в группе И он составил $0,4 \pm 0,1$, то в группе К был достоверно ($p < 0,001$) ниже – $0,2 \pm 0,1$, повышаясь в группе О до $0,5 \pm 0,1$, что достоверно превышало значения здоровых животных ($W = 701,5/p = 0,002$) и крыс с моделью РА ($p < 0,001$).

Лимфоцитам принадлежит важная роль в развитии РА. Исследователями обнаружено, что при переносе определенного количества лимфоцитов от животного с адъювантным артритом здоровому животному у последнего возникает артрит. У больных РА внутри пула Т-лимфоцитов наблюдается увеличение количества клеток с преимущественно хелперной активностью [17]. Нарушение количества или активности регуляторных Т-лимфоцитов играет фундаментальную роль в инициации и персистенции РА [21]. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, представляющих собой наиболее многочисленные популяции лейкоцитов, и отражающих базовые характеристики неспецифического и специфического звеньев иммунитета, принимающих участие в воспалительных реакциях, в частности, показывает выраженность аутоиммунной патологии. При этом увеличение количества нейтрофильных элементов можно связать с развитием неспецифического воспаления, а повышение уровня лимфоцитов, наблюдавшееся нами при экспериментальном РА, свидетельствует об активации специфического аутоиммунного процесса. Действие большинства основных препаратов при лечении РА направлено на иммуносупрессию, в том числе на снижение уровня лейкоцитов (в частности лимфоцитов) и подавлении воспаления [15].

В ходе проведенного медико-биологического эксперимента достоверно установлено, что длительное употребление настоя *Z. bungeana* способствовало нормализации лейкоцитарной формулы крови животных с моделью РА. Восстанавливался уровень лимфоцитов, повышался уровень эозинофилов и моноцитов. Количество сегментоядерных нейтрофилов превышало значения у интактных крыс. Отмечено сходство воздействия на изучаемые показатели биологически активных соединений *Z. bungeana* и *A. foeniculum* с присущими для эфирномасличных и лекарственных растений семейства Lamiaceae лекарственными свойствами.

Заключение

Полученные результаты подтверждают предположение о позитивном влиянии, оказываемом водным настоем ЛРС *Ziziphora bungeana* на лейкоцитарную формулу крови крыс с ревматоидным артритом, что, возможно, связано с улучшением процессов кроветворения и иммунологической реактивности, вызванных действием биологически активных веществ растения на клеточный метаболизм. Требуется дальнейшие углубленные исследования в этом направлении с последующей рекомендацией для применения данного лекарственного средства в качестве вспомогательного при терапии системных аутоиммунных заболеваний.

Список литературы

1. Бимурзаев А.А. Фитохимическое изучение Зизифоры: дис. канд. фарм. наук. – Алматы, 1985. – С. 12-17.
2. Глухов А.З., Горлачева З.С., Кустова О.К. Эфирномасличные и пряно-ароматические растения (интродукция, адаптивная стратегия, оценка перспективности выращивания). – Донецк: Восток – Пресс – Плюс, 2013. – 238 с.
3. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. – С.-Пб., 2012. – 48 с.
4. Дудченко Л.Г., Козьяков А.С., Кривенко В.В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения. – К.: Наукова думка, 1989. – 304 с.
5. Жапаркулова К.А. Фармацевтическая разработка лекарственных средств на основе растительного сырья *Ziziphora bungeana* Juz. – Дисс. д-р. филос. наук. – Казахстан, Алматы, 2016. – 138 с.
6. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: «Вища школа», 1983. – 382 с.
7. Кароматов И.Д., Абдуллаева Д.А., Кучиева Ф.И. Зизифора – перспективное лекарственное средство // Биология и интегративная медицина. – 2021. – № 3. – С. 101-114.
8. Карписонова Р.А. Оценка интродукции многолетников по данным визуальных наблюдений. Методики интродукционных исследований в Казахстане. – Алма-Ата: Наука, 1987. – С. 36-37.
9. Кустов Д.Ю., Кустова О.К., Приходько С.А., Глухов А.З., Шевченко Т.А. Иммуномодулирующее действие *Agastache foeniculum* на параметры крови у самок белых крыс с моделью ревматоидного артрита // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2018. – Т. 27, №1. – С. 63-69.
10. Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А. Анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat. – Донецк: Изд-во ДонНМУ, 2006. – 214 с.
11. Машанов В.И., Покровский А.А. Пряноароматические растения. – М.: Агропромиздат, 1991. – 287 с.
12. Патент №114862, UA. МПК: G09B 23/28. Спосіб моделювання ревматоїдного артриту / Д.Ю. Кустов, І.В. Кокіна, Т.А. Реготун, Я.С. Валігун. Заява №u201609475 від 13.09.2016. Друк. 27.03.2017.
13. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – К.: Вища школа, 1988. – 318 с.
14. Флора СССР. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. – Т. 21. – 703 с.
15. Delano D.L., Montesinos M.C., Desai A., Wilder T., Fernandez P., D'Eustachio P., Wiltshire T., Cronstein B.N. Genetically based resistance to the antiinflammatory effects of

methotrexate in the air-pouch model of acute inflammation // *Arthritis Rheum.* – 2005. – Vol. 52(8). – P. 2567-2575.

16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.

17. Kimpel D., Dayton T., Kannan K., Wolf R.E. Streptococcal cell wall induced arthritis: leukocyte activation in extra-articular lymphoid tissue // *Inflammation.* – 2003. – Vol. 27(2). – P. 59-70.

18. Smejkal K., Malanik M., Zhaparkulova K., Sakipova Z., Ibragimova L., Ibadullaeva G., Zemlicka M. Kazakhstan *Ziziphora* species as sources of bioactive substances // *Molecules.* – 2016. – № 21(7). – P. 54.

19. Soltani N.S. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against some pathogenic bacteria // *African Journal of Microbiology Research.* – 2012. – Vol. 6(7). – P. 1504-1508.

20. Verdian-Rizi M. Essential oil Composition and Biologocal activity *Ziziphora clinopodidoides* Lam. from Iran // *Research Jurnal of Pharmacology.* – 2008. – № 2(2). – P. 17-19.

21. Weng L., Williams R.O., Vieira P.L., Screation G., Feldmann M., Dazzi F. The therapeutic activity of low-dose irradiation on experimental arthritis depends on the induction of endogenous regulatory T cell activity // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69(8). – P. 1519-1526.

22. Zeng Z., Wang C., Wang B., Wang N., Yang Y., Guo S., Du Y. Prediction of neutrophil-to-lymphocyte ratio in the diagnosis and progression of autoimmune encephalitis // *Neurosci. Lett.* – 2019. – Vol. 694. – P. 129-135.

Статья поступила в редакцию 27.04.2023 г.

Prykhodko S.A., Kustov D.Yu., Kustova O.K., Glukhov A.Z. The influence of the *Ziziphora bungeana* Juz. extract on the leukogram in rats with a rheumatoid arthritis model // *Bull. of the State Nikita Botan. Gard.* – 2023. – № 147. – P. 83-89

The effect of long-term use of *Ziziphora bungeana* Juz. infusion for a leukogram in 30 laboratory white rats has been investigated. The animals were divided into 3 equal groups. The first one was intact (healthy) animals. The second group included test animals with a model of rheumatoid arthritis. The third one consisted of rats with arthritis who were treated with *Ziziphora* extract for 90 days. It was found that modeling rheumatoid arthritis causes a significant increase in the level of lymphocytes against the background of a decrease in the level of other leukocyte forms. Long-term use of *Ziziphora* extract contributes to the normalization of the white blood. The initial level of lymphocytes is restored, the level of eosinophils and monocytes increases. The number of segmented neutrophils even exceeds that of intact rats. Thus, *Ziziphora* extract proved to be an effective drug for correcting the leukogram in case of rheumatoid arthritis.

Key words: *extract of Ziziphora bungeana* Juz.; *rheumatoid arthritis*; *white blood formula*; *laboratory rats*