

## EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

### Krūminės perilės (*Perilla frutescens* (L.) Britton) įtaka nespecifiniam ląsteliniam imunitetui – fagocitozės aktyvumui

Genovaitė Šimonienė, Vilma Jurkštienė, Konstancija Jankauskienė, Virginijus Gailys, Egidijus Kėvelaitis, Petras Rimantas Venskutonis<sup>1</sup>

Kauno medicinos universiteto Fiziologijos katedra

<sup>1</sup>Kauno technologijos universiteto Maisto produktų technologijos katedra

**Raktažodžiai:** *Perilla frutescens* (L.) Britton, fagocitozė, imunostimuliatoriai.

**Santrauka.** Tyrimo tikslas. Ištirti augalinės kilmės preparatų, pagamintų iš Lietuvoje introdukuoto augalo *Perilla frutescens* (L.) Britton poveikį nespecifiniam ląsteliniam imunitetui.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Nespecifinis ląstelinis imunitetas vertintas pagal fagocitozės aktyvumą. Triušių periferinio kraujo leukocitų fagocitozės aktyvumo (leukocitų gebėjimas fagocituoti polistireno latekso daleles, kurių dydis 0,8 μm) tyrimai atlikti iki pradedant eksperimentus (kontrolė) ir po jų (po ekstrakto injekcijų vieną savaitę ir keturias savaites maitinimo davus gerti ekstrakto). Ekstraktai pagaminti iš perilės lapų reperkoliacijos būdu. Tyrimams in vitro naudotas perilės ekstrakto tirpalas, kuriame buvo 1 mg/ml tiriamosios medžiagos. Tyrimams in vivo buvo tirti preparatai: 1) vandeninis perilės lapų ekstrakto 32 proc. sterilus tirpalas; 2) spiritinio perilės lapų ekstrakto 38 proc. vandeninis sterilus tirpalas.

Rezultatai. Fagocitozės aktyvumo tyrimai in vitro parodė, kad fagocitozės reakcija po 30 min. inkubacijos su *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstraktu stimuliuojama nuo 39±1,2 iki 61±2,2 proc. (p<0,001). Fagocitozės indeksas, rodantis, kiek vienas fagocitas geba fagocituoti latekso dalelių, padidėjo nuo 1,26 iki 1,79.

Tyrimų in vivo duomenys rodo, jog po perilės preparatų injekcijų 1,2 mg/kg triušiams, fagocitozės aktyvumas padidėjo palyginus su kontrole iki tyrimų (32,17±2,13 proc.). Ypač padidėjo fagocitozės aktyvumas po septynių paras skirtų injekcijų – 40,67±4,68 proc. Davus perilės preparatų triušiams gerti per zondą, jų periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės aktyvumo rodikliai padidėjo jau po savaitės, tačiau didžiausias fagocitozės aktyvumas nutatytas keturias savaites skyrus preparato (62,00±2,76 proc.).

Išvados. Nustatyta, kad perilės (*Perilla frutescens* (L.) Britton) sudėtyje esančios veikliosios medžiagos stiprina nespecifinį ląstelinį imunitetą, didina fagocitų aktyvumą tiek in vivo, tiek in vitro.

#### Įvadas

Imuninės sistemos ligos vadinamos imunodeficitais, kurie gali būti pirminiai (igimti) ir antriniai (įgyti). Sergamumas didesnis antriniais imunodeficitais, kuriuos sukelia įvairūs veiksniai, tokie kaip bakterijos, virusai, helmintai, cheminės medžiagos, vaistai, radiacija, stresas. Imuninė sistema slopinama sergant alerginėmis ligomis, bronchų astma, onkologinėmis ir kt. ligomis (1). Imunodeficitinių būklių metu padidėja sergamumas infekcinėmis ligomis, nes organizmas negeba greitai sunaikinti infekcijos sukėlėjų. Šių būklių metu padidėja infekcijos išplitimo galimybė,

aktyvėja oportunistinės infekcijos, sukeltos adeno virusų, citomegalo virusų ir kt. (2). Sėkmingas imuninės sistemos nepakankamumo gydymas priklauso nuo to, kurioje sistemos grandyje yra defektas.

Per evoliuciją susiformavęs organizmo gebėjimas apsiginti nuo įvairių išorės veiksnių, galinčių sukelti imuninės sistemos patologiją, vadinamas nespecifiniu atsparumu, kurio vienas iš veiksnių yra fagocitozė. Preparatų, efektyviai skatinančių imuninės sistemos veiklą yra nedaug, o specifinė imunostimuliacija skiepais taikoma tik atskirų infekcinių ligų profilaktikai. Šiuo metu daug dėmesio skiriama nespecifiniams

imunostimuliacijoms, aktyvinantiems nespecifinio imuniteto grandį – fagocitozę (ji kartu su antigeną pristatančiomis ląstelėmis susiduria su svetimkūniais ir juos fagocituoja). Vis plačiau vartojami augaliniai nespecifiniai imunostimuliaciniai, skatinantys fagocitozę, kurie mažiau sensibilizuoja ir pasižymi mažesniu šalutiniu poveikiu už sintetinius preparatus (3–5). Jiems priklauso krūminės perilės (*Perilla frutescens* (L.) Britton) preparatai.

Krūminė perilė yra mėtinių šeimos augalas, kilusi iš Pietryčių bei Rytų Azijos, kur auginama kaip komercinė kultūra, kuri naudojama įvairiose srityse. Sėklos vartojamos žmonių maistui ar gyvulių pašarų gamybai; sėklų aliejus – kaip degalai, taip pat valgiams gaminti; iš lapų išskirtas distiliuotas aliejus – kaip eterinis aliejus parfumerijos gamybai; lapai – kaip maisto prieskoniai, maistui ruošti bei medicinoje (6). XIX a. pradžioje emigrantai iš Azijos šalių perilę atvežė į Šiaurės Ameriką, kur ji greitai prisitaikė ir dabar paplitusi kaip vienmetė piktžolė, užauganti iki 1 metro aukščio. Dėl didelių raudonų karpų bei pūkuotų lapų ir stipraus mėtų aromato naudojama parkams, sodams apželdinti. Lapai kartais būna tokie dideli ir raudoni, jog primena supjaustytą jautieną, todėl perilė dar vadinama „biftekiniu augalu“. Augalas žydi liepos–spalio mėnesiais, nunyksta tik gruodžio mėnesį. Sėklas brandina ankstyse, kurios vėjuje stipriai barška (todėl dar vadinama „gyvatės barškuolės“ piktžole). Azijoje dar vadinamas „Ao Shiso“, purpurine mėta, kinų baziliku, laukiniu sezamu (7, 8).

Šio darbo tikslas – ištirti Lietuvoje introdukuotos *Perilla frutescens* (L.) Britton preparatų poveikį nespecifiniam ląsteliniam imunitetui, jų įtaką fagocitozės aktyvumui *in vitro* ir *in vivo*.

### Tyrimo medžiaga ir metodai

Tirti preparatai, pagaminti iš krūminės perilės, išaugintos Lietuvoje, Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių augalų kolekcijoje. Iš antžeminės dalies buvo pagaminti skystieji ir sausieji perilės lapų ekstraktai.

Per pirmąjį tyrimų etapą *in vitro* atlikta triušių periferinio kraujo leukocitų ląstelių kultūrų inkubacija su perilės ekstrakto tirpalu izotoniniame NaCl tirpale, kuriame buvo 1 mg/ml tiriamosios medžiagos. Tyrimams naudotas perilės preparatas, pagamintas Kauno technologijos universiteto Maisto produktų technologijos katedroje.

Per antrąjį tyrimų etapą tirtas *Perilla frutescens* (L.) Britton preparatų, pagamintų Kauno medicinos universiteto Farmacinės chemijos ir farmakognozijos katedroje, poveikis imuninei sistemai (*in vivo*). Reper-

koliacijos būdu pagaminti du preparatai: 1) vandeninis perilės lapų ekstraktas, kurio sausųjų medžiagų kiekis buvo 0,32 g/ml, tai yra paruoštas 32 proc. sterilus tirpalas; 2) 40° spiritinio perilės lapų ekstrakto vandeninis tirpalas, kuriame sausųjų medžiagų kiekis buvo 0,38 g/ml, tai yra paruoštas 38 proc. sterilus tirpalas.

Pirmos grupės triušiams buvo sušvirškta vandens perilės ekstrakto 32 proc. tirpalo, o kitai triušių grupei – spiritinio perilės ekstrakto 38 proc. tirpalo. Šių ekstraktų tirpalų kartą per dieną buvo švirškčiama triušiams po 0,1 ml/kg.

Triušių periferinio kraujo imunologiniai tyrimai atlikti iki pradendant eksperimentus (kontrolė) ir po jų (praėjus 24 val. po vieno sušvirškimo, praėjus 72 val. po trijų sušvirškimų ir praėjus savaitei po injekcijų).

Per trečiąjį eksperimentų etapą tirtas sausojo *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstrakto, pagaminto Kauno technologijos universiteto Maisto produktų technologijos katedroje, poveikis ląsteliniam nespecifiniam imunitetui.

Tirtos dvi triušių grupės. Vienos grupės triušiams per zondą kas dieną buvo sugirdoma po 2 ml sausojo ekstrakto tirpalo, kuriame buvo 0,01 g/kg veikliosios medžiagos, kitos grupės – po 2 ml sausojo perilės ekstrakto tirpalo, kuriame buvo po 0,1 g/kg veikliosios medžiagos.

Moksliniai eksperimentai daryti su šešių mėnesių šinšilos veislės 2,8–3,3 kg svorio triušiais (leidimas naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam darbui Nr. 0112, išduotas 2004-05-05 Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos).

Nespecifinis ląstelinis imunitetas vertinamas pagal leukocitų funkcijos kokybinę būklę, kurią sąlygoja fagocitozės aktyvumas. Jis tirtas modifikuota metodika pagal pirmojo lygio imunologinių testų kompleksą, rodantį triušių periferinio kraujo leukocitų gebėjimą fagocituoti 0,8 μm dydžio polistireno latekso daleles. Fagocitozės aktyvumo tyrimo etapai:

I. Leukocitų suspensijos ruošimas. Tyrimui paimta po 2 ml triušių periferinio kraujo į mėgintuvėlį su antikoagulantu (heparino tirpalu) ir ruošama leukocitų suspensija. Triušių kraujas sumaišomas su želatinos tirpalu ir inkubuojama termostate 30 min. Po to ląstelės atskiriamos Henkso tirpalu centrifuguojant 10 min. (1000 aps/min.) ir kelis kartus nupilamas viršutinis skysčio sluoksnis.

II. Latekso suspensijos ruošimas. 5 μl koncentruotos polistireno latekso suspensijos kelis kartus atplaunama fiziologiniu tirpalu, centrifuguojama po 10 min. (1500 aps./min.) ir nupilamas skystis.

III. Fagocitozės reakcija. Ji atliekama 96 duobučių mikroplokštelėje imunologinėms reakcijoms. Sulaši-

nama po 50 µl leukocitų ir latekso suspensijos į kiekvieną mikroplokštelės duobutę ir po 30 min. inkubacijos dažoma Žadorožnio-Dozmorovo leukocitų dažais, kurie sustabdo fagocitozės reakciją, nudažo leukocitų branduolius ir suardo tirpalo eritrocitus. Goriajevo kameroje apskaičiuotas latekso daleles fagocitavusių leukocitų procentas iš visų suskaičiuotų leukocitų, tai yra fagocitozės aktyvumas.

Apskaičiuotas ne tik fagocitozės aktyvumas, bet ir fagocitozės indeksas, kuris rodo fagocitų kokybinę funkciją, kiek vienas fagocitas geba fagocituoti latekso dalelių.

**Statistinė duomenų analizė.** Statistinė duomenų analizė atlikta statistine programa „SPSS 12,0 Viewer“ remiantis bandymų statistinio reikšmingumo *p* duomenimis. Eksperimentų duomenys: vidurkis ir standartinis nuokrypis. Bandomųjų grupių duomenų skirtumai tarp duomenų vidurkių įvertinti naudojant Studento (*t*) kriterijų. Skirtumas statistiškai reikšmingas, kai  $p < 0,05$ .

### Eksperimentų rezultatai

Pirmiausia fagocitozės aktyvumo tyrimai buvo atlikti *in vitro*. Neutrofilų fagocitinis aktyvumas įvertinamas latekso fagocitozės reakcija po 30 min. inkubacijos su *Perilla frutescens* (L.) Britton 50 µl antžeminės dalies ekstraktu. Palyginimui kraujo ląstelės inkubuotos su fiziologiniu tirpalu. Fagocitozės reakcijos plokštelėje, veikiant perilės antžeminės dalies preparatu, duomenys pateikti pirmoje lentelėje. Jie rodo, kad periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės aktyvumo ir fagocitozės indekso reikšmės statistiškai reikšmingai padidėjo ( $p < 0,001$ ) (1 lentelė).

Eksperimentai *in vivo* atlikti švirksčiant į raumenis

**1 lentelė. Triušių periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės aktyvumo ir indekso kitimai (*in vitro*) po inkubacijos su 50 µl *Perilla frutescens* (L.) Britton antžeminės dalies preparato**

Rodmenys	Kontrolė	Po inkubacijos su <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton preparatu	t	p
FA, proc.	39±1,2	61±2,2	8,8	<0,001
Fi	1,26	1,79	6,46	<0,001

FA – fagocitozės aktyvumas; Fi – fagocitozės indeksas.

**2 lentelė. Triušių periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės aktyvumo kitimai po *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstraktų sušvirksčimo (1,2 mg/kg)**

FA rodikliai	Triušių kontrolė	I grupė po 24 val.	II grupė po 24 val.	I grupė po 72 val.	II grupė po 72 val.	I grupė po 1 sav.	II grupė po 1 sav.
FA, proc.	32,17±2,13	33,00±2,10	32,50±2,63	34,67±2,55	33,83±3,00	40,67±4,68	39,67±4,95
p	–	0,473	0,742	0,096	0,273	0,002	0,006

FA – fagocitozės aktyvumas; I grupė (n=6) – po vandeninio perilės ekstrakto 32 proc. tirpalo sušvirksčimo; II grupė (n=6) – po spiritinio perilės ekstrakto 38 proc. tirpalo sušvirksčimo.

arba sugirdant per zondą triušiams *Perilla frutescens* (L.) Britton įvairių koncentracijų ekstraktų. Rezultatai rodo, kad perilės preparatai, vartojami įvairiais būdais, aktyvina kraujo neutrofilų fagocitinį aktyvumą, kurio priklausomumas nuo *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstraktų veikliųjų medžiagų dozės bei vartojimo būdo buvo tirtas keliais etapais.

Fagocitozės aktyvumo rodikliai tirti iki pradendant tyrimus ir po 24 val., po 72 val. ir po vienos savaitės *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstraktų tirpalų injekcijų triušiams (po 1,2 mg/kg) pateikiami antroje lentelėje.

Tyrimų duomenys rodo, jog po *Perilla frutescens* (L.) Britton injekcijų triušiams periferinio kraujo leukocitų fagocitozės aktyvumas padidėjo palyginus su kontrole (2 lentelė). Tačiau statistiškai reikšmingai fagocitozės aktyvumas padidėjo tik po septynių parų vartojimo ( $p < 0,002$ ).

Tirtas ne tik fagocitozės aktyvumas po perilės preparatų injekcijų, bet ir po šio preparato sugirdymo per zondą. Periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės aktyvumo rezultatai prieš ir po 0,01 g/kg bei po 0,1 g/kg preparatų vartojimo pateikiami trečioje lentelėje.

Dėl *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstrakto poveikio fagocitozės aktyvumas maksimaliai padidėjo po keturių savaičių, girdant ekstraktą per zondą, iki 62,00±2,76 proc., t. y. rodikliai statistiškai reikšmingai padidėjo 92,73 proc. ( $p < 0,001$ ).

### Rezultatų aptarimas

Tyrimų duomenimis, *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstrakto sudėtyje esančios veikliosios medžiagos, kai duota geriamojo ekstrakto, labiau aktyvina periferinio kraujo neutrofilų gebėjimą fagocituoti latekso

**3 lentelė. Triušių periferinio kraujo neutrofilų fagocitozės aktyvumo kitimai po preparatų sugirdymo**

FA, proc.	Kontrolė	Po 1 sav.		Po 2 sav.		Po 3 sav.		Po 4 sav.	
		I grupė	II grupė						
FA, proc. ±	32,17 2,13	50,17 2,33	54,50 2,96	39,50 2,91	40,33 4,25	44,33 1,69	51,00 5,03	62,00 4,03	59,67 2,76
P<	–	0,001	0,001	0,002	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001

FA – fagocitozės aktyvumas. Pirmą triušių grupę (n=6) girdyta per zondą kasdien po 0,01 g/kg perilės ekstrakto. Antra triušių grupė (n=6) girdyta per zondą po 0,1 g/kg perilės ekstrakto.

daleles negu skyrus injekcijomis. Pateikti duomenys rodo, kad fagocitozės aktyvumas padidėjo jau po vienos savaitės, tačiau didžiausias fagocitozės aktyvumo rodiklis, veikiant *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstraktu, buvo keturias savaites davus geriamojo ekstrakto.

Tyrimo duomenimis, *Perilla frutescens* (L.) Britton vandeniniai ir etanoliniai ekstraktai aktyvuoja triušio kraujo fagocitus *in vitro* ir *in vivo*. Fitopreparatų imunostimuliuojantis veikimas dar nepakankamai ištirtas, bet manoma, jog jis gali būti susijęs su esančiomis riebalų rūgštimis ir kitais biologiškai veikliais junginiais.

Skirtingų *Perilla frutescens* (L.) Britton dalių cheminė sudėtis įvairi. Augalo lapuose yra apie 0,2 proc. įvairios cheminės sudėties eterinių aliejų. Pagal tai perilė skirstoma į keletą skirtingų chemotipų. Vienas dažniausiai auginamų ir vienintelis, kuris vartojamas maistui gaminti ir farmacijos pramonėje, yra perilės aldehidinis chemotipas. Pagrindinis komponentas (75 proc.) yra perilaldehidas, kuris dažnai sukelia odos alerginių reakcijų. Mažesniais kiekiais išskiriama limoneno (13 proc.), linalolio, β-kariofilino, l-mentolio, α-pineno, perileno ir elemicino.

Vienas iš perilaldehido darinių yra perilartinas, kuris pasižymi tuo, jog apie du tūkstančius kartų saldesnis nei cukrus, todėl Japonijoje vartojamas kaip dirbtinis saldiklis. Be to, augalas turtingas pseudotaninų ir antioksidantų, kurie būdingi mėtinių šeimos augalams, taip pat apigenino, askorbo rūgšties, β-karotino, kofeino rūgšties, liuteolino, dilapiolio, protokatechino rūgšties, kvarcetino, rozmarininės rūgšties (8, 9).

Iš perilės sėklų (40 proc. jų masės) išskiriamas aliejus, turintis didelį kiekį nesočiųjų riebalų rūgščių. Iš jų 60 proc. yra linolo rūgšties (omega-6), 15–20 proc. – α-linolenos rūgšties (omega-3) ir 15 proc. – oleino rūgšties (9, 10). Linolo ir α-linolenos rūgštys yra nepakeičiamosios riebalų rūgštys, kurių organizmas nesintetina, jų būtina gauti su maistu. Šios rūgštys

padeda imuninei sistemai kovoti su infekcija, didindamos peroksidų gamybą, būtinos fosfolipidų sintezei, yra prostaglandinų ir leukotrienų biosintezės grandinės sudedamoji dalis, reikalingos oksidaciniam ir metaboliniam procesams skatinti bei energijai didinti. Nepakeičiamosios riebalų rūgštys, esančios ląstelės struktūrinių lipidų sudėtyje (membranų fosfolipidai), yra svarbios susidarant mitochondrijų membranoms. Trūkstant nepakeičiamųjų riebalų rūgščių, jų vietą fosfolipiduose ir kituose sudėtiniuose membranų lipiduose užima kitos omega-9 eilės polieninės rūgštys. Žmonėms, kurių maiste trūksta nepakeičiamųjų riebalų rūgščių, prasideda dermatitai, sutrinka lipidų pernaša (10).

Kita nepakeičiamoji riebalų rūgštis yra α-linolenas, kitaip vadinama omega-3 riebalų rūgštimi, kartu su derivatais priklauso omega-3 supernočiųjų riebalų rūgščių šeimai. Jų pakankamai turi žuvų taukai bei linų aliejus, tačiau jie dažnai sukelia nepageidaujama šalutinių poveikių virškinimo sistemai. Aliejus, pagamintas iš *Perilla frutescens* (L.) Britton, yra ne tik turtingas omega-3 nepakeičiamųjų riebalų rūgščių šaltinis, tačiau kartu neturi jokio šalutinio poveikio, puikiai pasisavinamas bei toleruojamas. Moksliniai tyrimai patvirtino, kad, vartojant perilės aliejų kaip omega-3 rūgščių šaltinį, sumažėja lipidų koncentracija kraujyje, kartu ir rizika sirgti ateroskleroze bei išemine širdies liga, širdies infarktu, aritmija (8, 11). Be to, sumažėja uždegiminių citokinų, TNF (navikų nekrozės faktoriaus), arachido rūgšties darinių išsiskyrimas, dėl kurių pasireiškia reumatoidiniai artritai, kolitai, daugelis kitų autoimuninių ligų, atitolinamas ląstelių senėjimas (12–14). Šis augalas ypač veiksmingas gydant onkologines ir degeneracines ligas. Perilės aliejus mažina riziką sirgti krūtims ir storosios žarnos vėžiu (15, 16). Be to, jis efektyvus gydant įvairias alergijas, ypač alergiją jūros maistui (krabams, žuvims) (17). Moksliniai tyrimai rodo, jog perilės preparatai veiksmingai naudojami gydyti tokias alergines būkles, kaip

bronchų astma, anafilaksinė reakcija (18). Be to, perilės ekstraktas mažina tiek vietines, tiek sisteminės alergines reakcijas, nes slopina histamino atsipalaidavimą iš mastocitų (putliųjų ląstelių) (19). Tuo galima paaiškinti priešuždegiminį jos poveikį, nes įrodyta, jog perilės sudėtyje esanti rosmarino rūgštis ir kiti cheminiai junginiai slopina alerginį uždegimą (20, 21).

Gana platus *Perilla frutescens* (L.) Britton vartojimas medicinoje. Azijos tautų vaistinių augalų žinovai perilę skirdavo kaip vaistą nuo kosulio ir kvėpavimo sistemos ligų, apsaugoti nuo gripo infekcijos, apsinudijus jūros maistu, esant netaisyklingai subalansuotai mitybai. Jau daugelį metų žinoma, jog perilė pasižymi antibakteriniu, antiseptiniu poveikiu (7, 22–24). Įvairūs perilės preparatai mažina karščiavimą, kosulį, lengvina atsikosėjimą, turi spazmolitinių bei tonizuojamųjų savybių, taip pat veiksmingi priepuoliams nutraukti, spazmams šalinti. Augalo preparatai pasižymi ir stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, apsaugo ląsteles ir lėtina jų senėjimo procesus (25, 26).

Šio tyrimo duomenimis, *Perilla frutescens* (L.) Britton ekstraktai turi ir imunostimuliuojančių savybių, skatina ląstelinį nespecifinį imunitetą – fagocitozę. Literatūros duomenimis, iš perilės lapų išskirti polisacharidai stipriai aktyvuoja makrofagus *in vitro*, skatina įvairių gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų fagocitozę. Be to, nustatyta, kad jis didina kai kurių mediatorių, tokių kaip azoto oksido, alfa-TNF,

interleukino-6 (IL-6) ir granuliocitų, monocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus (GM-CSF) kiekį *in vivo* (27). Šias savybes lemia perilės sudėtyje esančios omega-3 šeimos riebalų rūgštys, kurios stimuliuoja leukocitų funkcijas, veikia uždegimo požymius, sąlygotus arachido rūgšties darinių (28). Kiti autoriai nurodo, jog makrofagų funkcijas stimuliuoja, neutrofilų chemotaksį ir transmigraciją didina bei priešuždegiminiu veikimu pasižymi perilės ekstrakto sudėtyje esanti rozmarino rūgštis, antocianinai, flavonoidai bei fenolinė rūgštis (29). Panašiu poveikiu, galinčiu keisti fagosomų aktyvumą, pasižymi ir  $\alpha$ -linoleno rūgštis, išgauta iš perilės aliejaus (30).

#### Išvados

Preparatai, pagaminti iš *Perilla frutescens* (L.) Britton augalo antžeminės dalies, didina fagocitozę *in vitro*. Tą rodo fagocitozės aktyvumo ir indekso statistiškai reikšmingas padidėjimas ( $p < 0,001$ ) po ląstelių inkubacijos su preparatu.

Eksperimentais *in vivo* su triušiais nustatyta, jog *Perilla frutescens* (L.) Britton vandeninis ir spiritinis ekstraktai skatina vieną iš nespecifinio imuniteto veiksmių – fagocitozės aktyvumą (po injekcijų ir po geriamojo preparato vartojimo).

#### Padėka

Dėkojame šį darbą rėmusiam Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui (sutartis Nr. C-03/2005).

## The influence of common perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britton) on non-specific cell-mediated immunity – phagocytosis activity

Genovaitė Šimonienė, Vilma Jurkštienė, Konstancija Jankauskienė, Virginijus Gailys, Egidijus Kėvelaitis, Petras Rimantas Venskutonis<sup>1</sup>

Department of Physiology, Kaunas University of Medicine

<sup>1</sup>Department of Food Technology, Kaunas University of Technology, Lithuania

**Key words:** *Perilla frutescens* (L.) Britton, phagocytosis, immunostimulators.

**Summary. Objective.** To examine the effect of plant preparations, obtained from *Perilla frutescens* (L.) Britton introduced in Lithuania, on non-specific cell-mediated immunity.

**Materials and methods.** Non-specific cellular immunity was estimated by phagocytosis activity. The study of phagocytosis activity in peripheral rabbits blood (ability of leukocytes to phagocyte polystyrene latex parts of 0.8  $\mu$ m diameter) was performed before (control) and after the experiments (injecting or administering *per os* perilla leaves extracts for one week and four weeks, respectively). The extracts were prepared from the leaves of perilla using repercolation method. For the studies *in vitro* the extract containing 1 mg/ml of perilla was used. In the studies *in vitro* two preparations of *Perilla frutescens* were used: 1) 32% sterile aqueous solution derivable from extract of perilla leaves and 2) 38% ethanol extract of perilla leaves.

**Results.** The phagocytosis activity studies *in vitro* showed that after 30 minutes of incubation with *Perilla frutescens* (L.) Britton extract phagocytosis activity was stimulated from 39 $\pm$ 1.2 to 61 $\pm$ 2.2% ( $p < 0.001$ ). Phagocytosis index increased from 1.26 to 1.79. The experiments *in vivo* showed that injected perilla leaves preparation to rabbits (1.2 mg/kg) increased phagocytic activity compared to the control (32.17 $\pm$ 2.13%). The

largest increase of phagocytosis activity was detected after seven days –  $40.67 \pm 4.68\%$ . Phagocytic activity of neutrophils in peripheral blood of rabbits increased after oral administration of perilla leaves extracts already after one week, but the largest increase of phagocytic activity was detected after four weeks ( $62.00 \pm 2.76\%$ ).

**Conclusions.** *Perilla frutescens* (L.) Britton contains natural substances that increase the activity of phagocytes *in vivo* and *in vitro* and stimulate phagocytosis.

Correspondence to G. Šimonienė, Department of Physiology, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 44307 Kaunas, Lithuania. E-mail: simogene@one.lt

## Literatūra

- Ficher A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat Immunol* 2004;5(1):23-30.
- Novikov DK, Novikova VI, Sergejev JV. Vtorichnyje imunodeficitnyje bolezni. (Secondary immunodeficiency diseases.) *Imunologija alergologija infektologija* 2003;(2):8-27.
- Jurkštienė V, Kondrotas A. Preparatų, pagamintų iš rausvažiedės ežiulės (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) poveikis fagocitozei. (Effect of preparations of *Echinacea purpurea* (L.) Moench on phagocytosis.) *Medicina* (Kaunas) 2001;37(6):631-5.
- Jurkštienė V, Kondrotas AJ, Kėvelaitis E. Imuninės sistemos kompensacinės reakcijos ir rausvažiedės ežiulės (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) preparatų poveikis. (Compensatory reactions of immune system and action of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) preparations.) *Medicina* (Kaunas) 2004;40(7):657-62.
- Šimonienė G. Augalinės kilmės imunostimulioriaus Helepin D farmakologinės savybės. Įtaka fagocitozei. (The pharmacological properties of plant origin immunostimulants Helepin D. influence on phagocytosis.) *Medicina* (Kaunas) 1999;35(4):407-13.
- Medvedev VV. Perilla – novoje pishchevoje rastenije. (Perilla – a new food plant). In: Selekcija, ekologija, technologija vzdelyvanija i pererabotki netradicionykh rastenij. Materialy II Mezhdunarod Nauk Konf; Simferopol'; 1996. p. 62.
- Ragažinskienė O, Gailys V, Jankauskienė K, Šimonienė G, Jurkštienė V. Krūminė perilė (*Perilla frutescens* (L.) Britton) – perspektyvus imunomoduliorius. (Common Perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britton) as a perspective immunomodulator.) *Medicina* (Kaunas) 2004;40(3):220-4.
- Jackson D, Shelton K. Perilla (*Perilla frutescens*). *Alternat Nat Online Herbal* 2000:1-2.
- Longwah T, Deosthele Y. Chemical and nutritional studies on *Perilla frutescens*. *J Am Oil Chem Soc* 1991;68(10):781-4.
- Shin HS, Kim SK. Lipid composition of perilla seed. *J Am Oil Chem Soc* 1994;71(6):619-22.
- He-Ci-Yu, Kosuna K, Haga M. The Genus Perilla. Netherlands Overseas Publishers: Association; 1997.
- Yamazaki M. Inhibition by perilla juice of tumor necrosis factor production. *Biosci Biotechn Biochem* 1992;56:149-52.
- Ueda H, Yamazaki M. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production by orally administering a perilla leaf extract. *Biosci Biotechn Biochem* 1998;61(8):1292-5.
- Yamamoto H, Sakakibara J, Nagatsu A, Sekiya K. Inhibitors of arachidonate lipoxygenase from defatted perilla seed. *J Agricult Food Chem* 1997;46(3):862-5.
- Kim S. The Perilla oil prevents the excessive growth of viscerales adipose tissue in rats by down regulating adipocyte differentiation. *J Nutr* 1997;127(9):1752-7.
- Komaki C, Okuno M, Onogi N. Synergistic suppression of azoxymethane-induced foci of colonic aberrant crypts by the combination of beta carotene and perilla oil in rats. *J Carcinogenesis* 1996;17(9):1897-901.
- Makino T, Furuta Y, Wakushima H et al. Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother Res* 2003;17(3):240-3.
- Makino T, Furuta Y, Fujii H, et al. Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. *Biol Pharm Bull* 2001;24(10):1206-9.
- Shin TY, Kim SH, Kim YK, et al. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Perilla frutescens*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000;22(3):489-500.
- Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, et al. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin Exp Allergy* 2004;34:971-7.
- Ueda H, Yamazaki M. Anti-inflammatory and Anti-allergic actions by oral administration of a perilla leaf extract in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(7):1673-5.
- Kang R, Helm R, Stout M. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. *J Agricult Food Chem* 1992;40:2328-30.
- Ibrahim HR, Hatta H, Fujiki M, Kim-M, Yamamoto T. Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *J Agricult Food Chem* 1994;42(8):1813-7.
- Gailys V, Benetis R, Pavilionis A, Jankauskienė K, Šimonienė G. Išledovanija antimikrobnoji aktivnosti *in vitro* ekstraktov listjev perily (*Perilla frutescens* (L.) Britton). (Investigation on antimicrobial activity *in vitro* of *Perilla frutescens* leaves extract.) *Imunologija alergologija infektologija* 2004;3:59-63.
- Tada M, Matsumoto R, Yamaguchi H, Chiba K. Novel antioxidants isolated from *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* (Thunb.). *Biosci Biotechn Biochem* 1996;60:1093-5.
- Nagatsu A, Tenmaru K, Matsuura H, Murakami N, Kobayashi T. Novel antioxidants from roasted perilla seed. *Chem Pharm Bul* 1995;43:887-9.
- Kwon KH, Kim KI, Jun WI, Shin DH, Cho HY, Hong BS. *In vitro* and *in vivo* effects of macrophage-stimulatory polysaccharide from leaves of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biol Pharm Bull* 2002;259(3):367-71.
- Pompeia C, Lopes LR, Miyasaka CK, Procopio J, Sannomiya P, Curi R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(11):1255-68.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 2004;25(4):549-57.
- Ikemoto A, Fukuma A, Fujii Y, Okuyama H. Lysosomal enzyme activities are decreased in the retina and their circadian rhythms are different from those in the pineal gland of rats fed an  $\alpha$ -linolenic acid-restricted diet. *J Nutr* 2000;130:3059-62.

*Straipsnis gautas 2005 06 21, priimtas 2005 12 08*  
*Received 21 June 2005, accepted 8 December 2005*