

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ЭКОТОКСИКАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 Н.В. Расцветова, О.Ю. Кузнецова, И.Ф. Шаталаев
Самарский государственный медицинский университет
Статья получена 25.09.2009 г.

Исследовано влияние комплекса экотоксикантов экстракта почвы на активность НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов, супероксиддисмутазы эритроцитов и перекисную устойчивость эритроцитов крови жителей регионов, различной степени экологического напряжения. Показан дестабилизирующий эффект комплекса экотоксикантов экстракта почвы на клетки крови человека.

Ключевые слова: *экоксиканты, экстракт почвы, ферменты клеток крови человека*

Спецификой периода технического прогресса является глубокое вмешательство в окружающую среду. Воздействие агрессивных химических соединений на различные компоненты биогеоценозов не может не оставить следа. Закономерно, что нарушения, возникшие в литосфере, атмосфере, гидросфере сказываются на здоровье человека. Одним из основных патогенетических механизмов повреждающего действия экотоксикантов признано усиление свободно-радикальных процессов в организме.

Целью данного исследования стало изучение функционального состояния НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов, супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов и перекисной устойчивости эритроцитов при действии комплекса экотоксикантов экстракта почвы.

Методика исследования. Объектом исследования были выбраны клетки крови лиц, проживающих в экологически относительно благополучном регионе (п. Красная Глинка Самарской области); в регионе антропогенного загрязнения (г. Новокуйбышевск Самарской области); в районе экологического неблагополучия и жестких климатических условиях Крайнего Севера (г. Когалым Ханты-Мансийского национального округа). Всего обследовано 177 человек, из них по результатам полного клинико-лабораторного обследования 101 были признаны практически здоровыми. У 76 некурящих лиц с хроническим бронхитом (с обострениями не чаще 2 раз в год) исследование проводилось в стадию ремиссии.

Взятие крови и разделение клеток крови осуществлялось по методам, предложенным

В.В. Меньшиковым и др. [4]. Активность НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов определялась по методу [7], активность супероксиддисмутазы по методу [2], перекисная устойчивость эритроцитов методом [6], содержание белка по методу [3]. Для характеристики сбалансированности про- и антиоксидантной систем нами было предложено рассчитывать соотношение активностей ферментов СОД/оксидазы, названное коэффициентом эффективности антиоксидантной защиты.

Сбор образцов почвы проводился по методу [5]. Экстракт почвы получали добавлением к 1 части почвы 2 частей бидистиллированной воды с последующей гомогенизацией и экспозицией продолжительностью 15 мин. Экстракт отделяли от осадка фильтрованием и изотонировали кристаллическим натрия хлоридом до конечной концентрации 0,16 мМ. Проводили инкубацию клеток крови с экстрактом почвы (10 мин, 37°C), пробы охлаждались (+4°C, 15 мин), центрифугировались (1500 об/мин, 10 мин). В образцах клеток определялись исследуемые показатели. Экспериментальные данные были статистически обработаны [1].

Результаты исследования и их обсуждение. Химические предприятия вследствие образования не утилизируемых промышленных отходов атмосферных выбросов являются источниками загрязнения почвы. Специфика ее контаминации по сравнению с другими сферами окружающей среды заключается в том, что в самой почве значительно ограничено разбавление и распространение вредных веществ от мест поступления. Приводим отдельные показатели экстракта почвы санитарной зоны химического предприятия региона экологического неблагополучия, использованного нами в опытах *in vitro* (табл. 1).

Результаты исследования *in vitro* показали, что в ответ на воздействие экотоксикантов

Расцветова Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель. E-mail: rastsvetova_nv@list.ru

Кузнецова Ольга Юрьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета

экстракта почвы на лейкоциты здоровых жителей п. Красная Глинка (группа сравнения) произошло значительное ингибирование НАДН- и НАДФН-оксидаз (-92,4%; $p < 0,05$) по сравнению с исходным показателем (табл.2). Среднее значение активности составило $3,15 \pm 0,99$ УЕ. Понижилась также и активность супероксиддисмутазы на 67,5% ($p < 0,05$). Коэффициент эффективности антиоксидантной защиты в этой группе лиц составил 4,9. Изменения в про- и антиоксидантной системах сопровождались увеличением процента гемолиза эритроцитов (в среднем до $90,62 \pm 2,60\%$).

Таблица 1. Характеристика экстрактов почвы различных регионов

Показатели	Экстракт почвы региона экологического благополучия	Экстракт почвы региона техногенного загрязнения
Активность НАДН- и НАДФН-оксидаз, УЕ	$23,670 \pm 0,964$	$36,890 \pm 0,689$
Активность СОД, ед/мг белка	$0,907 \pm 0,051$	$1,259 \pm 0,036$
pH	$7,740 \pm 0,171$	$8,020 \pm 0,003$
Удельная электропроводность, mS	$0,258 \pm 0,005$	$0,126 \pm 0,004$
Водорастворимый белок, мг/мл	$0,023 \pm 0,001$	$0,016 \pm 0,002$

Таблица 2. Активность НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов, супероксиддисмутазы эритроцитов, процент перекисного гемолиза эритроцитов крови обследованных лиц после инкубации с комплексом экотоксикантов экстракта почвы

Группы	Данные эксперимента in vivo			Данные эксперимента in vitro		
	Активность		Гемолиз эритроцитов, %	Активность		Гемолиз эритроцитов, %
	оксидаз, УЕ	СОД ед/мг белка		оксидаз, УЕ	СОД ед/мг белка	
1	$41,63 \pm 5,37$	$49,51 \pm 6,34$	$87,05 \pm 1,66$	$3,15 \pm 0,99^{**}$	$15,59 \pm 2,44^{**}$	$90,62 \pm 2,60$
2	$31,31 \pm 10,27^*$	$36,80 \pm 4,53^*$	$83,02 \pm 3,78$	$2,40 \pm 1,03^{**}$	$24,80 \pm 3,86^{**}$	$86,07 \pm 3,42$
3	$12,20 \pm 0,79^*$	$71,75 \pm 2,36^*$	$89,84 \pm 1,83$	$3,40 \pm 0,18^{**}$	$44,15 \pm 1,44^{**}$	$91,36 \pm 2,67$
4	$4,68 \pm 0,84^*$	$27,13 \pm 4,72^*$	$93,22 \pm 2,39^*$	$6,39 \pm 2,06^*$	$17,91 \pm 3,59^{**}$	$94,24 \pm 4,09$
5	$4,21 \pm 0,52^*$	$7,18 \pm 2,46^*$	$92,46 \pm 1,71^*$	$36,69 \pm 5,98^{**}$	$36,69 \pm 5,98^{**}$	$96,59 \pm 2,02^*$
6	$6,71 \pm 1,95^*$	$15,79 \pm 2,22^*$	$94,96 \pm 2,13^*$	$20,97 \pm 1,98^{**}$	$33,19 \pm 1,03^{**}$	$98,56 \pm 1,07^*$

Примечание. 1 группа – п. Красная Глинка, практически здоровые жители; 2 группа – п. Красная Глинка, лица с хроническим бронхитом; 3 группа – г. Новокуйбышевск, практически здоровые жители; 4 группа – г. Новокуйбышевск, лица с хроническим бронхитом; 5 группа – г. Когалым, практически здоровые жители; 6 группа – г. Когалым, лица с хроническим бронхитом.

* - результаты достоверно отличаются от данных, полученных в 1 группе (группа сравнения) ($p < 0,05$); ** - результаты достоверно отличаются от данных, полученных in vivo ($p < 0,05$).

При сравнительном анализе изменений, возникших в клетках крови жителей п. Красная Глинка, страдающих хроническим бронхитом под влиянием суммы токсичных веществ экстракта почвы, выявлены следующие особенности. Наблюдаемое угнетение функционирования НАДН- и НАДФН-оксидаз (-92,3%; $p < 0,05$) лейкоцитов данных лиц аналогично установленному в группе сравнения. В результате контакта экотоксикантов экстракта почвы с эритроцитами жителей п. Красная Глинка, имеющих хронический бронхит, деятельность супероксиддисмутазы понизилась, но не столь резко как у здоровых, а на 32,6% ($p < 0,05$). Коэффициент эффективности антиоксидантной защиты превысил показатель группы сравнения – 10,3. Тенденция к увеличению процента

перекисного гемолиза у данных лиц аналогична таковой у здоровых жителей п. Красная Глинка. Обращает внимание факт сохранения соотношения (1: 0,95) процента гемолиза эритроцитов здоровых и больных жителей экологически относительно благополучного региона после инкубирования с экстрактом почвы (табл. 2).

Характеризуя изменения, вызванные инкубацией с экстрактом почвы крови здоровых жителей Новокуйбышевска необходимо отметить достоверное снижение НАДН- и НАДФН-оксидазной активности лейкоцитов на 72,1% ($p < 0,05$). Полученное значение практически не отличалось от соответствующего показателя у здоровых жителей Красной Глинки (табл. 2). Контакт с экотоксикантами

почвы вызвал также понижение активности супероксиддисмутазы на 38,5% ($p < 0,05$). У лиц данной группы коэффициент эффективности антиоксидантной защиты равен 12,9. Установлено, что гемолиз эритроцитов после инкубации их с экстрактом почвы увеличился всего до $91,36 \pm 2,67\%$, что практически не отличается от показателя здоровых жителей Красной Глинки ($90,62 \pm 2,60\%$). В результате воздействия комплекса экотоксикантов экстракта почвы на лейкоциты жителей Новокуйбышевска, имеющих хронический бронхит, НАДН- и НАДФН-оксидазная активность увеличилась на 36,6% ($p < 0,05$). Анализируя полученные *in vitro* результаты, можно сказать, что оксидазы лейкоцитов данной группы жителей функционируют интенсивнее на 88,1% ($p < 0,05$), чем у здоровых жителей из этого же региона и на 165,9% ($p < 0,05$), чем у больных п. Красная Глинка.

Усиление процесса образования активного кислорода под воздействием экстракта почвы сопровождалось одновременным ингибированием фермента антиоксидантной защиты на 34,0% ($p < 0,05$). Сравнительный анализ показал, что супероксиддисмутаза жителей Новокуйбышевска с хроническим бронхитом функционировала гораздо слабее ($-59,4\%$; $p < 0,05$), чем у здоровых жителей этого же города и что активность фермента была достоверно ниже чем у жителей Красной Глинки с таким же заболеванием ($-27,8\%$; $p < 0,05$) (табл. 2). Коэффициент эффективности антиоксидантной защиты у жителей Новокуйбышевска с хронической патологией составил 2,8, что значительно ниже соответствующих значений коэффициента в двух группах жителей Красной Глинки и группы здоровых в Новокуйбышевске.

Характеризуя динамику перекисного гемолиза эритроцитов после инкубации с экстрактом почвы крови больных жителей Новокуйбышевска можно отметить отсутствие достоверных различий с исходным значением. Но обращает внимание разница средних значений у данной группы лиц ($94,24 \pm 4,09$) и у больных п. Красная Глинка ($86,07 \pm 3,42$). Как показали результаты анализа, после взаимодействия экстракта почвы с лейкоцитами крови здоровых жителей Когалыма отмечен резкий подъем активности НАДН- и НАДФН-оксидаз ($+772,2\%$; $p < 0,05$). При сопоставлении полученного среднего значения с другими, становится очевидным, что оно в 10,8 раз больше, чем у здоровых жителей Новокуйбышевска, и в 11,6 раз выше, чем у здоровых жителей Красной Глинки. Установлено, что у данного контингента после нагрузки экотоксикантами увеличилась не только деятельность НАДН- и НАДФН-оксидаз, но и супероксиддисмутазы, причем весьма значительно ($+411,0\%$; $p < 0,05$). Обращает внимание изменение соотношения активностей супероксиддисмутазы здоровых

жителей Красной Глинки и Когалыма до эксперимента (1:0,15) и после (1:2,4). Коэффициент антиоксидантной защиты равен 1,0.

Отмечена тенденция повышения процента перекисного гемолиза после воздействия экотоксикантов на эритроциты здоровых жителей Когалыма. Выявленное до инкубации различие уровня гемолиза между группами здоровых жителей Красной Глинки и Когалыма сохранилось в модельном опыте (табл. 2). Установленная *in vitro* тенденция изменений активности ферментов у здорового контингента Когалыма прослеживалась и среди жителей этого города, имеющих хронический бронхит. НАДН- и НАДФН-оксидазы увеличили свою активность на 212,8% ($p < 0,05$) после контакта с экстрактом почвы. В сравнении с аналогичной системой у здоровых жителей Красной Глинки в данном случае генерация активных форм кислорода протекала в 6,6 раз интенсивнее. Как уже было замечено, после взаимодействия с экстрактом почвы защитное действие супероксиддисмутазы эритроцитов этой группы лиц повысилось в 2,1 раза. Во столько же раз определенный показатель больше, чем в группе сравнения.

При сопоставлении полученных *in vitro* значений активности супероксиддисмутазы становится очевидно, что фермент антиоксидантной защиты у больных жителей Когалыма функционирует почти в 2 раза эффективнее, чем у больных жителей Новокуйбышевска. Отличия полученных средних значений активности супероксиддисмутазы для двух групп жителей Когалыма не столь велики. Коэффициент антиоксидантной защиты у данной группы выше, чем у здоровых жителей Когалыма – 1,6. Полученные результаты показали, что действие экотоксикантов экстракта почвы вызвало рост процента перекисного гемолиза эритроцитов у больных жителей Когалыма. После инкубирования сохранилось различие ($+14,5\%$) средних значений процента гемолиза эритроцитов у больных, проживающих в Когалыме и в п. Красная Глинка. Практически не изменилась разница между показателями двух групп жителей Когалыма.

Выводы:

1. Под влиянием суммы токсичных веществ экстракта почвы в клетках крови жителей экологически относительно благополучного региона Средней полосы России произошло значимое угнетение НАДН- и НАДФН-оксидаз и супероксиддисмутазы, сопровождающееся снижением перекисной устойчивости мембран эритроцитов.

2. У здоровых жителей района экологического неблагополучия Средней полосы России произошли аналогичные изменения, но не на столь высоком уровне и при сохранении устойчивости мембран эритроцитов на прежнем уровне.

3. У жителей района экологического неблагополучия Средней полосы России, имеющих хроническое заболевание, в ответ на нагрузку химических агентов усилились процессы образования супероксидных анион-радикалов при одновременном ослаблении защитной способности супероксиддисмутазы, но при относительной стабильности эритроцитарных мембран.

4. После контакта клеток крови жителей региона экологического и климатического напряжения развился метаболический «взрыв», проявившийся в резком подъеме активности НАДН- и НАДФН-оксидаз и супероксиддисмутазы. Установленные изменения сопровождались существенным снижением устойчивости эритроцитарных мембран к перекисному гемолизу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гланц, С. / Медико-биологическая статистика / С. Гланц // М.: Практика, 1999. – 460 с.
2. Дубинина, Е.Е. / Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // Лаб. дело. – 1983. - № 10. – С. 30-33.
3. Кочетов, Г.А. / Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов // М., Высшая школа, 1980. – С. 222-223.
4. Меньшиков, В.В. / Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др. // М.: Медицина, 1987. – 368 с.
5. Перельгин, В.М. / Гигиена почвы и санитарная очистка населенных мест / В.М. Перельгин, В.В. Разнощик // М.: Медицина, 1997. – 192 с.
6. Покровский, А.А. / К вопросу о перекисной резистентности эритроцитов / А.А. Покровский, А.А. Абраров // Вопр. питания. – 1964. - № 6. – С. 44-49.
7. Okamura, N. Facile release of NADPH-oxidase from leukocyte / N. Okamura, T. Takano, S. Ishibashi // Chem. pharm. Bull. – 1976. – V.24. – P. 2175-2180.

INFLUENCE OF ECOTOXICANTS COMPLEX ON ACTIVITY OF HUMAN BLOOD CELLS ENZYMES

© 2009 N.V. Rastsvetova, O.Yu. Kuznetsova, I.F. Shatalaev
Samara State Medical University
Article is received 2009/09/25

Influence of ecotoxicants complex from soil extract on activity NADH- and NADPH-oxidases leucocytes, superoxide dismutase of erythrocytes and peroxide resistance of erythrocytes of blood in inhabitants of regions with various degree of ecological strain is researched. The destabilizing effect of ecotoxicants complex from soil extract on human blood cells is shown.

Key words: *ecotoxicants, soil extract, enzymes of human blood cells*