

СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТВЕТА КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2010 Н.В. Расцветова, О.Ю. Кузнецова, И.Ф. Шаталаев

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 14.07.2010

Исследовано влияние экстракта хвои сосны обыкновенной на активность НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов, супероксиддисмутазы эритроцитов и перекисную устойчивость эритроцитов крови жителей регионов, различной степени экологического напряжения. Показаны положительные антиоксидантные и мембраностабилизирующие эффекты комплекса биологически активных веществ хвои *Pinus silvestris* L. на клетки крови человека.

Ключевые слова: экологическое неблагополучие. Клетки крови, экстракт сосны обыкновенной.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема загрязнения окружающей среды на сегодняшний день является одной из острейших. Изменения, возникающие в атмосфере, литосфере или гидросфере в результате хозяйственной деятельности, приводят к различным сдвигам в организме самого 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 компонентов экстракта хвои сосны обыкновенной региона техногенного загрязнения.

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

Расцветова Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры химии фармацевтического факультета.

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.

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. [7]. Активность НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов определялась по методу [11], активность супероксиддисмутазы по методу [2], перекисная устойчивость эритроцитов методом [10], содержание белка по методу [4]. Сбор образцов хвои проводился по методу [8]. Экстракт хвои получали добавлением к 1 части измельченной зеленой массы 5 частей бидистиллированной воды с последующей гомогенизацией и экспозицией продолжительностью 15 мин. Экстракт отделяли от осадка фильтрованием и изотонировали кристаллическим натрием хлоридом до конечной концентрации 0,16 мМ. Проводили инкубацию клеток крови с экстрактом хвои (10 мин, 37°C), пробы охлаждали (+4°C, 15 мин), центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин). В образцах клеток определяли исследуемые показатели.

Экспериментальные данные были статистически обработаны [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая тесную взаимосвязь компонентов биогеоценоза нами было проведено исследова-

ние *in vitro* прямого действия суммы компонентов экстракта хвои сосны обыкновенной региона техногенного загрязнения.

Исследуя эффекты суммы компонентов экстракта хвои сосны на интактные клетки крови, мы выявили следующие закономерности.

У здоровых жителей популяции средней полосы (как Красной Глинки, так и Новокуйбышевска) после инкубации клеток крови с экстрактом хвои сосны на фоне угнетения активности оксидаз и СОД устойчивость эритроцитарных мембран к перекисным соединениям существенно не изменилась (табл.1).

У лиц, проживающих в средней полосе в различных экологических условиях и страдающих хроническим бронхитом, изменения показателей про- и антиоксидантных систем после контакта с компонентами хвои *in vitro* имеют отчасти противоположно направленный характер: у больных экологически относительно благополучного района это проявляется в снижении функциональной активности оксидаз (- 60,0%; $p < 0,05$); у больных района антропогенного загрязнения, наоборот, в значительном повышении уровня оксидазной активности (+108,9%; $p < 0,05$). При этом изменения в прооксидантной системе в обеих группах сочетаются с повышением эффектив-

ности ферментативной защиты от супероксид-радикалов (+23,5%; $p < 0,05$ и +24,7%; $p > 0,05$ соответственно) и снижением процента перекисного гемолиза эритроцитов (табл.1).

Наиболее существенные метаболические сдвиги, носящие характер «дыхательного взрыва», развиваются под влиянием экстракта хвои в клетках крови всех жителей Крайнего Севера. Установлена чрезвычайно бурная активация оксидазной системы (+1059,2%; $p < 0,05$ в группе здоровых и +585,3%; $p < 0,05$ в группе больных) при не столь резко выраженной активации СОД (+213,9%; $p < 0,05$ у здоровых и +87,8%; $p < 0,05$ у больных), что сопровождается снижением количества гемолизированных эритроцитов (табл.1).

Таким образом, при всем многообразии количественного выражения изменений деятельности ферментов про- и антиоксидантной систем, а также их направленности после прямого контакта с суммой компонентов хвои налицо факт значимого повышения перекисной устойчивости мембран эритроцитов.

Объяснения эффектов биологически активных веществ экстракта хвои сосны не могут быть однозначными. Одной из особенностей метаболизма сосны является наличие в хвое чрезвычай-

Таблица 1. Активность НАДН- и НАДФН-оксидаз лейкоцитов, супероксиддисмутазы эритроцитов, процент перекисного гемолиза эритроцитов крови обследованных лиц после и после инкубации с комплексом компонентов экстракта хвои

Г Р У П П Ы	Данные эксперимента <i>in vivo</i>			Данные эксперимента <i>in vitro</i>		
	Активность		Гемолиз эритроцитов, %	Активность		Гемолиз эритроцитов, %
	оксидаз, УЕ	СОД ед/мг белка		оксидаз, УЕ	СОД ед/мг белка	
1	41,63 ±5,37	49,51 ±6,34	87,05 ±1,66	25,46 ±5,13**	22,30 ±5,79**	89,64 ±1,94
2	31,31 ±10,27*	36,80 ±4,53*	83,02 ±3,78	12,51 ±1,73* **	45,48 ±3,37* **	80,54 ±7,62*
3	12,20 ±0,79*	71,75 ±2,36*	89,84 ±1,83	4,85 ±2,24* **	35,96 ±2,43* **	92,84 ±1,82
4	4,68 ±0,84*	27,13 ±4,72*	93,22 ±2,39*	9,79 ±2,01* **	33,82 ±2,25*	88,94 ±7,54**
5	4,21 ±0,52*	7,18 ±2,46*	92,46 ±1,71*	48,77 ±4,12* **	22,54 ±0,10**	86,16 ±2,65**
6	6,71 ±1,95*	15,79 ±2,22*	94,96 ±2,13*	45,95 ±6,83* **	29,65 ±3,13* **	83,95 ±6,83* **

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* ($p < 0,05$).

но мощной системы генерации активных форм кислорода, обеспечивающих, в частности, бактерицидность летучих соединений хвои и не менее эффективную систему защиты собственных структур от повреждающего действия супероксидрадикалов. Помимо ферментного антиоксидантного звена в хвое в очень большом количестве содержатся неферментные антиоксиданты: аскорбиновая кислота, каротины, витамины К и Е, флавоноиды. Способностью гасить свободно-радикальные процессы обладают также фенольные кислоты и их гликозиды, обнаруженные в хвое. Фенольные соединения связывают ионы металлов в устойчивые комплексы, тем самым лишая их каталитического действия, а также служат акцепторами образующихся при аутооксидации свободных радикалов [3, 5, 6, 9].

Явно меньший подъем активности СОД после инкубации эритроцитов с хвойным экстрактом по сравнению с активацией оксидаз лейкоцитов при сохранении устойчивости мембран эритроцитов или даже повышении толерантности их к перекисным соединениям может быть связан, на наш взгляд, прежде всего с однозначно положительным эффектом мощного комплекса низкомолекулярных антиоксидантов хвои, исключающих необходимость максимального ответа ферментативного звена.

Обобщая вышесказанное, суммарный эффект составляющих экстракта хвои сосны обыкновенной региона техногенного напряжения на процессы свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов следует признать положительным.

Серия опытов *in vitro* позволила, таким образом, выяснить структуру молекулярного ответа клеток крови жителей различных климато-экологических регионов на действие компонентов экстракта хвои сосны обыкновенной региона техногенного напряжения.

ВЫВОДЫ

Сравнительный анализ результатов, полученных в опытах по прямому воздействию суммы компонентов экстракта хвои сосны обыкновенной региона техногенного напряжения на клетки крови человека позволил выявить следующие закономерности:

1. Контакт с экстрактом хвои вызвал однонаправленные изменения в крови здоровых жителей популяции Средней полосы России, выразившиеся в значительном угнетении функций

НАДН- и НАДФН-оксидаз и супероксиддисмутазы, тенденции к снижению перекисной устойчивости мембран эритроцитов. У жителей Новокуйбышевска как представителей региона антропогенного загрязнения вышеуказанные изменения протекали на фоне значительно более низкого уровня активности ферментов.

2. У лиц, проживающих в относительно экологически благополучном регионе, но страдающих хроническими заболеваниями, взаимодействие с комплексом компонентов хвои привело к ингибированию оксидаз, но активации супероксиддисмутазы при существенном повышении устойчивости мембран эритроцитов к перекисному гемолизу.

3. Наиболее выраженные метаболические сдвиги развиваются под влиянием экстракта хвои в крови всех жителей Когалыма и у больных хроническими заболеваниями, проживающих в Новокуйбышевске. Установлено резкое повышение активности ферментов как системы генерации активных форм кислорода, так и антиоксидантной защиты, наиболее бурно протекающее у лиц, представляющих популяцию северного региона. Вышеуказанные изменения сопровождаются значимым повышением перекисной устойчивости эритроцитарных мембран.

4. Наблюдаемые изменения обусловлены, вероятно, положительным эффектом как мощного комплекса низкомолекулярных антиоксидантов хвои, так и ферментного звена ее антирадикальной защиты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гланц С. / Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 1999. 460 с.
2. 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. Запрометов М.Н. / Фенольные соединения. М.: Наука. 1993. 272 с.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М., Высшая школа. 1980. С. 222-223.
5. Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высшая школа. 1986. 503 с.
6. Минаева В.Г. / Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука. Сибир. отд-е. 1991. 431с.
7. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая [и др.]. М.: Медицина. 1987. 368 с.
8. Перельгин, В.М., Разнощик В.В. / Гигиена почвы и санитарная очистка населенных мест. М.: Медицина. 1997. 192 с.
9. Лекарственные препараты на основе диквертина / М.Б. Плотников, Н.А. Тюкавкина, Т.М. Плотникова // Томск: Изд-во Том. ун-та. 2005. 228 с.

10. Покровский, А.А., Абраров А.А. К вопросу о перекисной резистентности эритроцитов // *Вопр. питания.* 1964. №6. С.44-49.
11. Okamura N., Takano T., Ishibashi S. [et al.]. Facile release of NADPH-oxidase from leukocyte// *Chem. pharm. Bull.* 1976. V.24. P.2175-2180.

THE STRUCTURE OF MOLECULAR REPLY OF PINUS SYLVESTRIS L. NEEDLES EXTRACT COMPONENTS ON HUMAN BLOOD CELLS

© 2010 N.V. Rastsvetova, O.Yu. Kyznetsova, I.F. Shatalaev

Samara State Medical University

Analyzed the influence of components of *Pinus Sylvestris* L. needles extract on NADH- and NADPH-oxidase, superoxide dismutase enzyme activity and on peroxide resistant of erythrocytes. All the patients live in regions both the ecological exertion and the inclement climatic conditions. Discovered favorable effects of bioactive substance of *Pinus Sylvestris* L. needles extract to human blood cells.

Key words: ecological trouble. Blood cells, an extract of a pine ordinary.

Natalya Rastsvetova, Candidate of Biological Sciences, Assistant at the Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty. E-mail: rastsvetova_nv@list.ru

Olga Kyznetsova, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostic.

Ivan Shatalaev, Doctor of Biological Sciences, Professor at the Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty.