

Антиоксидантное действие гомогената расплода пчел

А.А. Чиркин*, Е.И. Коваленко, В.В. Зайцев*****

**Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машиерова»*

***Белорусский государственный университет*

****Унитарное предприятие «Витебская биофабрика»*

В работе представлены данные о влиянии гомогената расплода пчел на активность нейтрофильных лейкоцитов. Было исследовано: 1) образование нейтрофильными лейкоцитами активных метаболитов кислорода с участием НАДФН-оксидазы; 2) активность миелопероксидазы; 3) скорость окислительных процессов, катализируемых пероксидазами. Нейтрофильные лейкоциты изолировали из крови здоровых доноров методом разделения в градиенте плотности фиколл-урографина. Определение интенсивности генерации активных метаболитов кислорода клетками проводили хемилюминесцентным методом с использованием люминола для регистрации суммарной активности НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы или использованием люцигенина для оценки генерации $\cdot O_2^-$ при активации НАДФН-оксидазы. Установлено, что гомогенат расплода пчел оказывает ингибирующее действие на процессы окисления в системе, содержащей изолированную пероксидазу, а также в системе, содержащей активированные нейтрофильные лейкоциты. Эффективность действия препарата в отношении свободной пероксидазы на несколько порядков выше, чем эффективность ингибирования активности нейтрофильных лейкоцитов. Значительный ингибирующий эффект в отношении клеток проявляется при концентрациях препарата от 1 мкл/мл и выше. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что гомогенат расплода пчел может быть использован в качестве противовоспалительного средства для снижения вторичного повреждения тканей активированными нейтрофильными лейкоцитами и секретируемыми ими пероксидазами и активными метаболитами кислорода.

Ключевые слова: нейтрофильные лейкоциты, расплод пчел, хемилюминесцентный метод, антиоксидантное действие, противовоспалительное действие.

Antioxidant affect of homogenate of bee brood

A.A. Chirkin*, E.I. Kovalenko, V.V. Zaitsev*****

**Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masharov»*

***Belarusian State University*

****Unitary enterprise «Vitebsk biofactory»*

The paper presents data on the affect of the homogenate of bee brood on the activity of neutrophils. We investigated: 1) the formation of neutrophils active oxygen metabolites, with the participation of NADPH oxidase, 2) myeloperoxidase activity, and 3) the rate of oxidative processes catalyzed by peroxidases. Neutrophils were isolated from blood of healthy donors by density gradient separation in Ficoll-Urografin. Determination of the generation intensity of reactive oxygen metabolites by cells was performed by chemiluminescence method using luminol to register the total activity of NADPH oxidase and myeloperoxidase or using lucigenin to assess the generation of $\cdot O_2^-$ at activation of NADPH oxidase. It is established that the homogenate of bee brood has an inhibitory effect on the oxidation processes in a system containing isolated peroxidase, as well as in a system containing activated neutrophils. The effectiveness of the drug in relation to free peroxidase is manifolds higher than the efficiency of inhibition of neutrophil leukocytes. Significant inhibitory effect on cells is displayed at concentrations of the drug from 1 mkl / ml and higher. The obtained data testify to the fact that homogenate of bee brood can be used as anti-inflammatory drug to reduce secondary tissue damage by activated neutrophils and their secreted peroxidases and active metabolites of oxygen.

Key words: neutrophils, bee brood, chemiluminescent method, antioxidant effect, anti-inflammatory effect.

Воспаление представляет собой патологический процесс, развивающийся в васкуляризованных тканях и органах в ответ на любое местное повреждение (биологическое, механическое, термическое, лучевое, химическое) и проявляющийся в виде ряда поэтапных изменений, направленных на локализацию, разведение, изоляцию и устранение агента, вызвавшего повреждение, а также на восстановление поврежденной ткани.

Воспаление играет, в первую очередь, защитную роль. В то же время механизмы воспаления приводят к вторичному тканевому самоповреждению, поэтому в ряде случаев необходимо применение противовоспалительных средств для снижения повреждения тканей организма хозяина.

Важным этапом воспаления является хемотаксис (направленная миграция) лейкоцитов и осуществляемый ими фагоцитоз. Фагоциты (нейтрофилы, моноциты), участвуя в воспале-

нии, генерируют эндогенные окислители (активные формы кислорода и галогенов), оксид азота и высвобождают во внеклеточную среду гидролазы, пероксидазы, оказывающие сильный цитотоксический эффект на клетки паразитов и бактерий, как и на ткани организма хозяина. Именно с фагоцитами связывают вторичное самоповреждение тканей. Таким образом, вещества, оказывающие инактивирующее действие на фагоциты и/или снижающие интенсивность процессов окисления, уменьшающие интенсивность генерации активных кислородных метаболитов (АКМ), будут проявлять противовоспалительную активность.

Нейтрофилы и моноциты при активации медиаторами воспаления генерируют окислители с участием ферментов НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО). Нейтрофилы являются наиболее многочисленными лейкоцитами и содержат большое количество НАДФН-оксидазы и МПО. НАДФН-оксидаза представляет собой мембранно-ассоциированный фермент, катализирующий образование супероксидных анион-радикалов $\cdot\text{O}_2^-$ у наружной поверхности клеток или внутри фагосом. Из $\cdot\text{O}_2^-$ спонтанно или с участием фермента супероксиддисмутазы образуется H_2O_2 . МПО относится к водорастворимым ферментам класса пероксидаз, катализирующим окисление различных субстратов в присутствии пероксида водорода H_2O_2 . При функционировании МПО также генерируется гипохлорит OCl^- [1–6].

С начала 90-х годов прошлого века стали появляться работы об использовании препаратов из пчелиного расплода для повышения неспецифической резистентности организма. Систематические исследования химического состава пчелиного и, особенно, трутневого расплода были начаты в 2000–2005 годах [7–9]. В 2005 году сотрудниками Ставропольского государственного аграрного университета был запатентован препарат на основе личинок трутней (патент Российской Федерации на изобретение № 2258522 от 20 августа 2005 г. «Способ изготовления препарата из отходов пчеловодства для стимуляции организма животных»). Этот препарат содержал набор аминокислот и других низкомолекулярных биорегуляторов. Данные вещества обеспечили антиоксидантное действие препарата.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования было изучение антиоксидантной активности гомогената расплода пчел (ГРП) на образование активных метаболитов кислорода нейтрофильными лейкоцитами чело-

века, а именно на образование ими АКМ с участием НАДФН-оксидазы и МПО, а также на скорость окислительных процессов, катализируемых изолированными пероксидазами.

Материал и методы. В работе использованы декстран-500, фиколл-400, 30% раствор H_2O_2 , люминол, fMLP, пероксидаза хрена («Sigma», США), урографин («Schering AG», Германия), гепарин, латекс («Белмедпрепараты», Беларусь), NaCl , KCl , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaHCO_3 , глюкоза («Анализ-Х», Беларусь), препарат ГРП.

Выделение нейтрофилов из крови людей. Нейтрофилы изолировали из крови здоровых доноров разделением в градиенте плотности фиколл-урографина. Консервированную с гепарином кровь перемешивали из расчета 5:1 с 7% раствором декстрана-2000 в 0,15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин для седиментации эритроцитов при комнатной температуре. В пробирки наливали по 2 мл фиколл-урографина (собственного приготовления, плотность 1,077 г/см³), на который осторожно наслаивали по 9 мл содержащей лейкоциты плазмы, полученной в результате оседания эритроцитов, и центрифугировали в течение 30 мин при 400 g для разделения лейкоцитов по плотности. После центрифугирования всю надосадочную жидкость удаляли. Осадок, содержащий фракцию гранулоцитов, очищали от оставшихся эритроцитов, проводя гипотонический лизис в дистиллированной воде в течение 30 с. Осмотичность восстанавливали добавлением 0,3 моль/л NaCl . Затем клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л NaCl , центрифугируя в течение 8 мин при 400 g. Полученную фракцию гранулоцитов суспензировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (СБСР) при pH 7,3. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96% [1].

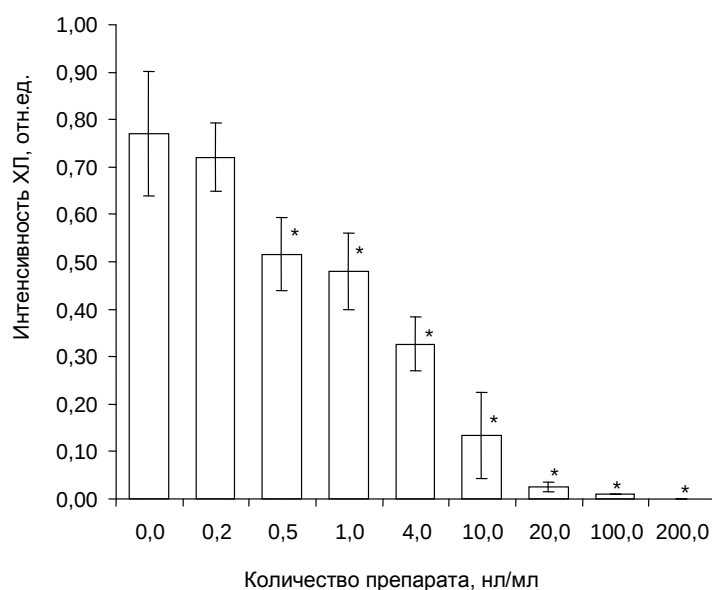
Исследование влияния препарата ГРП на реакции окисления, катализируемые пероксидазой. Пероксидаза хрена (ПХ) и миелопероксидаза нейтрофилов человека, как и другие пероксидазы, катализируют окисление субстратов в присутствии H_2O_2 . При использовании люминола в качестве субстрата образуется окисленная форма люминола в возбужденном состоянии (3-аминофталат), которая далее переходит в основное энергетическое состояние с выделением избытка энергии в виде световых импульсов. Излучение, испускаемое люминолом при его окислении (максимум полосы спектра испускания – 438 нм), представляет собой хемилюминесценцию (ХЛ), интенсивность которой

определяется скоростью химической реакции и при фиксированных концентрациях люминола и H_2O_2 отражает активность пероксидазы. Регистрацию ХЛ проводили с использованием компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», Беларусь). В кварцевую кювету для БХЛ-1 вносили ПХ (0,6 нг/л), препарат ГРП, люминол (25 мкмоль/л), СБСР Эрла рН 7,4 до полного объема пробы 1 мл. Кювету помещали в кюветное отделение БХЛ-1, затем в темноте инициировали реакцию окисления, внося в кювету 20 мкмоль/л H_2O_2 , и регистрировали кинетические зависимости интенсивности ХЛ. С помощью программы «Unichrom» рассчитывали интегральную интенсивность ХЛ, определяя площадь под кинетической кривой за время 1,5 мин. Этот параметр характеризует скорость реакции, катализируемой ПХ.

Регистрация генерации (активных кислородных интермедиатов) АКМ. Определение интенсивности генерации АКМ клетками проводили хемилюминесцентным методом с использованием люминола (Люм-ХЛ) для регистрации суммарной активности НАДФН-оксидазы и МПО или использованием люцигенина (Люц-ХЛ) для оценки генерации $\cdot\text{O}_2^-$ при активации НАДФН-оксидазы. В стеклянную кювету вносили препарат ГРП (2, 10, 50 мкл; в контрольных образцах – равное количество СБСР Эрла), суспензию нейтрофилов

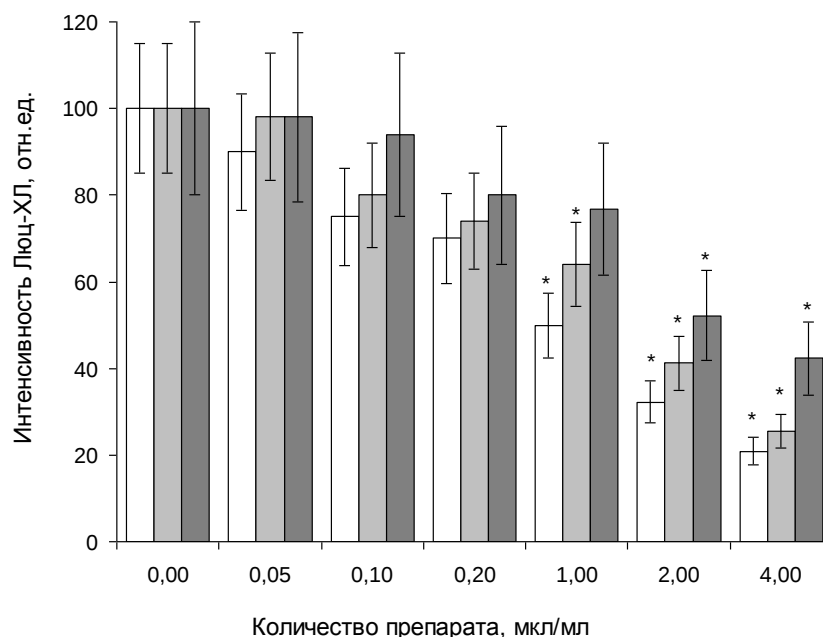
(2 млн клеток), люминол или люцигенин (25 мкмоль/л) как эмиттеры свечения, CaCl_2 (2 ммоль/л) и доводили объем пробы до 1 мл добавлением СБСР Эрла (рН=7,3). Помещали кювету в камеру биохемилюминометра БХЛ-1 («БГУ» – «Новые аналитические системы», Республика Беларусь) и регистрировали кинетические зависимости интенсивности ХЛ, обусловленной генерацией АКМ нейтрофилами при адгезии, в течение 10 мин, затем вносили хемоаттрактант fMLP (0,75 мкмоль/л) и регистрировали кинетику ХЛ в течение 4 мин, после чего добавляли латекс (20 мкл разведенной в 50 раз базовой суспензии) и регистрировали кинетическую зависимость интенсивности ХЛ в течение 5 мин. Далее проводили расчет интегральной интенсивности ХЛ за соответствующие временные промежутки с использованием программы Unichrom («Новые аналитические системы», Республика Беларусь). Исследования проводили при температуре 37°C [2–3, 6].

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены данные, характеризующие влияние препарата ГРП в различных концентрациях на скорость окислительных процессов, катализируемых пероксидазой ПХ. Как видно из иллюстрации, в присутствии препарата интенсивность окисления люминола, катализируемого ПХ, снижается. Это свидетельствует об ингибирующем действии препарата на пероксидазу. Достоверные различия по сравнению с контролем (без препарата) наблюдаются при внесении препарата в концентрации 0,5 нл/мл и выше (доверительная вероятность $p > 0,95$).



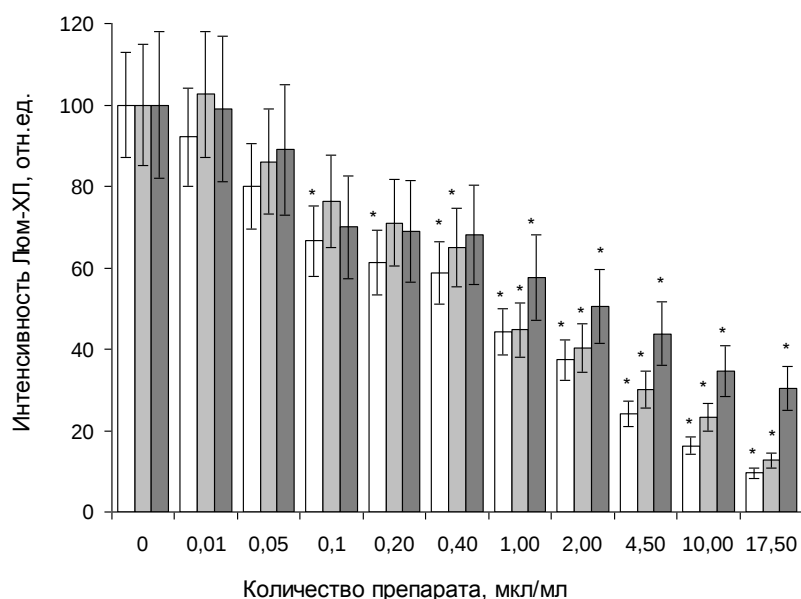
* – различия по сравнению с контролем достоверны с доверительной вероятностью $p > 0,95$, $n=3$

Рис. 1. Влияние препарата ГРП на активность ПХ.



* – различия по сравнению с контролем достоверны с доверительной вероятностью $p > 0,95$, $n=5$

Рис. 2. Влияние препарата ГРП на процессы образования нейтрофилами O_2^- при активации клеток в ходе адгезии (□), действии хемотаксического агента fMLP (■) и стимулятора фагоцитоза латекса (■).



* – различия по сравнению с контролем достоверны с доверительной вероятностью $p > 0,95$, $n=5$

Рис. 3. Влияние препарата ГРП на процессы образования нейтрофилами АКМ с участием НАДФН-оксидазы и МПО при активации клеток в ходе адгезии (□), действии хемотаксического агента fMLP (■) и стимулятора фагоцитоза латекса (■).

На рис. 2 и 3 показано влияние препарата на процессы образования нейтрофилами АКМ с участием НАДФН-оксидазы и МПО, анализируемые по интенсивности Люц-ХЛ и Люм-ХЛ клеток при их активации в ходе адгезии, дейст-

вии хемотаксического агента fMLP и стимулятора фагоцитоза латекса. Обнаружено, что препарат ГРП приводит к снижению генерации АКМ нейтрофилами при всех использованных видах стимуляции.

Как следует из рис. 2, достоверное уменьшение относительно контроля интенсивности Люц-ХЛ, характеризующей образование клетками $\cdot\text{O}_2^-$, выявляется при действии препарата ГРП в концентрации 1–2 мкл/мл и более ($p > 0,95$). Из рис. 3 видно, что при действии препарата ГРП в концентрациях 1–2 мкл/мл наблюдается снижение суммарной генерации АКМ нейтрофилами (с участием НАДФН-оксидазы и МПО) приблизительно на 50% при активации клеток как при адгезии, так и действии хемотаксического фактора fMLP и стимулятора фагоцитоза латекса. С увеличением концентрации препарата ГРП степень ингибирования активности нейтрофилов возрастает.

Таким образом, установлено, что препарат ГРП оказывает ингибирующее действие на процессы окисления в системе, содержащей изолированную пероксидазу, а также в системе, содержащей активированные нейтрофилы.

Заключение. Эффективность действия препарата в отношении свободной пероксидазы на несколько порядков выше, чем эффективность ингибирования активности нейтрофилов. Значительный ингибирующий эффект на клетки проявляется при концентрациях препарата от 1 мкл/мл и выше. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что препарат из гомогената расплода пчел может быть использован в качестве противовоспалительного средства для снижения вторичного повреждения

тканей активированными нейтрофилами и секретруемыми ими пероксидазами и активными метаболитами кислорода.

Работа поддержана грантом БРФФИ (договор № Б11ВТ-007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейум, А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов / А. Бейум // Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. – М.: Медицина, 1980. – С. 9–36.
2. Mueller, S. Light emission by luminol and its application / S. Mueller, J. Arnold // Albrecht S., Zimmermann T., Brandl H. Chemiluminescence at the turn of the millennium an indispensable tool in modern chemistry, biochemistry and medicine. – Dresden: Schweda-Werbedruck-Verlag, 2000. – P. 23–28.
3. Kavalenka, A.I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A.I. Kavalenka, G.N. Semenkov, S.N. Cherenkevich // Cell and Tissue Biology. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 551–559.
4. Borregaard, N. Granules and vesicles of human neutrophils. The role of endomembranes as source of plasma membrane proteins / N. Borregaard, L. Kjeldsen, K. Lollike // Eur. J. Haematol. – 1993. – Vol. 51. – P. 318–322.
5. Babior, B.M. NADPH oxidase: an update / B.M. Babior // Blood. – 1999. – Vol. 93, № 5. – P. 1464–1476.
6. Kavalenka, A.I. Systems of reactive oxygen species generation in human neutrophils: chemiluminescent analysis / A.I. Kavalenka [et al.] // Clin. Lab. – 2003. – Vol. 49. – P. 566.
7. Лазарян, Д.С. Изучение химического состава, оценка биологической активности пчелиного расплода и получение на его основе лекарственных препаратов: автореф. ... дис. д-ра фармацевт. наук / Д.С. Лазарян. – Пятигорск, 2002. – 42 с.
8. Лудянский, Э.А. Руководство по апитерапии (лечение пчелиным ядом, медом, прополисом, цветочной пыльцой и другими продуктами пчеловодства) для врачей, студентов медицинских вузов и пчеловодов / Э.А. Лудянский. – Вологда, 1994. – 298 с.
9. Монашенков, О.Н. Трутневый расплод – лечебное средство / О.Н. Монашенков // Пчеловодство. – 2005. – № 8. – С. 60–61.

Поступила в редакцию 20.01.2012. Принята в печать 16.04.2012

Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.