

УДК: 577.21. 575.224.6. 581.143.6

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА “КАНТЕПАРИН” НА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА БОЛИГОЛОВА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

В.И. МУЗЫКА¹, Г.П. МАКЕДОНОВ^{2*}, Л.В. ЦХОВРЕБОВА²,
И.В. КОЛОНИНА¹

¹ООО “Унгерния”, Москва, Россия

²Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, РАН, Москва, Россия.

*В данной работе исследовали влияние препарата Кантепарин на цитотоксическое действие спиртового экстракта болиголова (*Copium maculatum* из семейства зонтичные *Umbellifera*) на лимфоцитах человека. Было обнаружено защитное действие препарата Кантепарин, которое проявляется как в снижении общего количества гибнущих клеток, так и в уменьшении доли некрозов и, соответственно, увеличении доли апоптозов в спектре индуцированной гибели клеток. Факт снижения доли некрозов наиболее важен в случае возможного применения болиголова или других химиопрепаратов в сочетании с препаратом Кантепарин в качестве противоопухолевых агентов.*

Ключевые слова: препарат Кантепарин, цитотоксическое действие, экстракт болиголова, лимфоциты человека.

Введение. Издревле используемое в народной медицине растение болиголов содержит пять алкалоидов, из которых наиболее ядовитым является конииин [1]. Экстракты именно этого растения широко применяются в народной медицине при различных заболеваниях. Практически во всех странах мира его применяют в качестве онколитика. Именно к этому растению можно отнести слова Парацельса “Все в мире есть и лекарство и яд, и только доза отличает одно от другого”. Высокая доступность растения для населения, в том числе и для детей, может приводить к бытовым отравлениям. При использовании болиголова в лечебных целях возможны передозировки, опасные для здоровья человека. Учитывая вышесказанное, актуальным является поиск средств, которые можно использовать в качестве противоядия к болиголову (БГ).

© В.И. МУЗЫКА, Г.П. МАКЕДОНОВ, Л.В. ЦХОВРЕБОВА, И.В. КОЛОНИНА, 2008

* Адресат для корреспонденции: 119991, Москва, ул.Губкина, 3, ИОГен РАН
тел: (495)13289-59; факс:132-89-62; e-mail: makedonov@vigg.ru

Ранее были установлены защитные эффекты биологически активной добавки к пище (БАД) из выращенной биотехнологическим способом биомассы растения Унгерния викторис, Кантепарин (свид. о гос. регистрации №77.99.23.3 УЗ847.5.06), на культурах клеток лимфоцитов людей, длительное время проживавших на территориях, загрязненных радионуклидами [ссылка тезисы Пермь, 2]. Показано также антимуtagenное действие Кантепарина на перевиваемых культурах клеток человека [3].

Ранее [4] нами было установлено на клетках человека *in vitro*, что биологический эффект экстракта болиголова заключается в его цитотоксическом действии посредством апоптоза и некроза. Разумно было бы предположить, что защитные эффекты Кантепарина заключаются в блокировании одного из звеньев сигнальной системы индукции апоптоза. Что касается некроза, то здесь может быть задействован другой механизм, например, восстановление энергетики клетки.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на культуре лимфоцитов человека, культивируемых *in vitro*. Использовали венозную кровь клинически здоровых доноров. Лимфоциты выделяли из цельной крови центрифугированием в среде фикола-урографин. Выделенные лимфоциты культивировали в среде роста следующего состава: среда RPMI-1640–85%, сыворотка крупного рогатого скота – 15%, глютамин-2 мМ. Для стимуляции лимфоцитов к пролиферации в среду культивирования добавляли фитогемагглютинин в конечной концентрации 1%. Стимулированные ФГА (фирмы “ПанЭко”) лимфоциты культивировали с “Кантепарином”

в концентрации 1×10^{-5} и различными концентрациями препарата “Болиголов” в течение 72 ч. Препараты **Кантепарин** и **БГ** присутствовали в среде от начала и до конца культивирования. Каждый эксперимент был повторен более 3 раз.

Препарат БГ — растительный экстракт, использовали в концентрации от 10^{-3} до 10^{-5} от исходной. Препарат из растения болиголова получали путем настаивания свежих верхних частей растения в период начала плодоношения на этиловом спирте в соотношении 1:10. Спустя 14 суток готовый препарат фильтровали.

Тест на выживаемость при окраске трипановым синим. Этот тест используется для выявления мертвых клеток. Живые клетки не воспринимают красителя, поэтому мертвые клетки, окрашенные трипановым синим, легко распознаются под микроскопом. Окрашивание происходит в среде, состоящей из 1 части (0,4% трипанового синего) и 6 частей клеточной суспензии на растворе Хэнкса. Счет клеток осуществляется под микроскопом в камере Горяева.

Методика прижизненного окрашивания этидиум бромидом и акридиновым оранжевым позволяет микроскопически идентифицировать три типа клеток: 1) живые клетки — зеленого цвета; 2) некротические клетки — разбухшие клетки со смазанной морфологией ядра и нечеткой цитоплазматической оболочкой — обязательно красного цвета; 3) апоптотические клетки характеризуются следующими особенностями морфологии ядра: либо хроматин, сконцентрированный по ядерной оболочке, либо ядро в виде плотных глыбок хроматина, покрытых ядерной оболочкой. Они могут быть как зеленого — ранний апоптоз, так и красного цвета — поздний апоптоз.

При анализе препаратов определяли долю апоптозных, некротических и живых клеток.

Цитогенетический анализ фиксированных препаратов. Лимфоциты фиксировали смесью этанола и уксусной кислоты в течение 24 ч. Препараты раскапывали на предметные стекла и окрашивали красителем 3% Гимза в течение 3 минут. Цитологический и цитогенетический анализы осуществляли микроскопией в проходящем свете с использованием иммерсионного объектива, увеличение 100 × 12,5 и бинокулярной насадки.

При анализе препаратов определяли: а) число клеток с микроядрами (определение мутагенного потенциала препарата); б) плоидность клеток по анализу метафазных пластинок – определение числа хромосом (46 хромосом — диплоидный набор; 46 × 2 хромосом — тетраплоидный набор и т.д.).

Результаты и обсуждение

Данные анализа клеточной гибели в результате постоянного наличия в среде БГ от 1×10^{-3} до 1×10^{-5} и Канте-

парин 10^{-5} представлены в таблице и отражены в диаграмме.

Введение в среду Кантепарина приводит к повышенной выживаемости клеток (3-я и 7-я колонки).

Обращает на себя внимание тот факт, что доля живых клеток при обработке Кантепарин+БГ 10^{-3} ниже, чем при обработке только БГ 10^{-3} , однако пул клеток при обработке Кантепарин+БГ 1×10^{-3} в два раза выше (2-я колонка). Значит, общее количество живых клеток на флакон при обработке БГ выше, соответственно 6,9 и 11,05 (7-я колонка).

Кроме того, введение Кантепарина дает увеличение доли апоптозных клеток в общей структуре гибнущих клеток. Особенно выражено увеличение доли апоптозных клеток по отношению к некротическим при цитотоксическом эффекте БГ 10^{-4} от исходной концентрации. Достоверность разницы при применении метода χ^2 составляет меньше 0,001.

Причем, защитный эффект Кантепарина как по числу живых клеток, так и по соотношению апоптозных и не-

Таблица. Анализ клеточной гибели в результате постоянного наличия в среде БГ

1	2	3	4	5	6	7
Обработка клеток К; Кант; БГ	Пул клеток к контролю, %	Доля живых клеток	Доля гибнущих клеток	Апоптоз, %	Некроз, %	Доля живых клеток к контролю
+ - -	100	73	27	78	22	73,00
- + -	100	77	23	86	14	82,39
- - 10^{-3}	33±4,7	21	79	61	39	6,93
- - 10^{-4}	49±4,9	26	74	54	46	12,74
- - 10^{-5}	84±3,7	47	53	79	21	39,48
- + 10^{-3}	65±4,7	17	83	57	43	11,05
- + 10^{-4}	78±4,1	32	68	68	32	24,96
- + 10^{-5}	84±3,7	48	52	72	28	40,32

Примечания: 1. В вертикальных колонках 5-й и 6-й цифры в скобках – оценка доли соответствующих клеток среди гибнущих клеток. 2. 7-я колонка это интегральная цифровая оценка цитотоксического действия, вычисляемая по формуле: $n_7 = n_2 \times n_3$, где n_2 и n_3 — построчные показатели колонок N2 и N3 соответственно.

крозных клеток является минимальным при высокой и низкой концентрации и становится значительным, достоверным при промежуточной дозе Бг 1×10^{-4} . По всем показателям, представленным в таблице, пул клеток после воздействия Кантепарина превышает таковой при обработке только Бг (49 и 78). Наиболее заметно защита проявляется при концентрации Бг 1×10^{-4} от исходного.

Выводы

Основным результатом данной работы является снижение цитотоксического действия Бг под влиянием Кантепарина. Следует отметить, что защитный эффект Кантепарина различен при разных дозах Бг: при больших и малых концентрациях Бг он незначителен, а оптимален при средних концентрациях. В принципе, это означает, что осуществляется защита непосредственно тех структур, которые являются мишенью для повреждения болиголова. Поэтому дальнейшее изучение молекулярного механизма защиты клетки от цитотоксического действия болиголова представляет как научный, так и практический интерес.

Защитный эффект Кантепарина заключается не только в снижении общего уровня гибнущих клеток, а также в снижении доли клеток, гибнущих от некроза. Некроз является патологической формой гибели клетки и оказывает отрицательные последствия на здоровье человека – аллергические реакции, воспалительные и т. д. [5]. Например, при дозе Бг 10^{-4} доля живых клеток равна 26%, некротических из них 46%, а воздействие Кантепарина приводит как к увеличению живых клеток до 32%, так и к снижению доли не-

кротических клеток до 32% (приведены результаты типичного опыта).

Все наши рассуждения о защитном действии кантепарина в равной степени относятся как к использованию болиголова в качестве онколитика, так и при бытовом отравлении им.

Список литературы

1. Атлас лекарственных растений СССР / Под ред. Н.В.Цицина. — Гос.изд-во мед. литературы, 1962. — 704 с.
2. Musika V.I., Makedonov G.P., Kolonina I.V. Antimutagenic activity of the product vlairin in human cells taken from people inhabiting in districts contaminated by radionuclides// V International Conference "Environmental Pollution — ICEPT-2001", 18-25 September 2001 (Volgograd-Perm, Russia), Abstracts, Volgograd-Perm. — 2001. — P.127.
3. Македонов Г.П., Цховребова Л.В. Способ стимулирования апоптоза. Заявка о выдаче патента РФ на изобретение. — Регистрационный номер: 2006128999. — 2006
4. Можилевская Л.П., Адонин В.И., Дворник А.С., Музыка В.И., Колонина И.В., Кунах В.А. Культура тканей *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko. Получение, особенности и биологические эффекты экстракта. VIII Internat. Conf. "The biology of plant cell in vitro and Biotechnology" Abstr., Saratov, Sept. 9-13. — 2003. — С. 215.
5. WEJ-XING-Zong and Craig B.Thompson. Necrotic death as a cell fate. Genes and Development — 2006. — V.20. — P. 1-15.

Представлена И.Р. Барыляком
Поступила 11.10.07

ЗАХИСНИЙ ЕФЕКТ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО
ПРЕПАРАТА "КАНТЕПАРИН"
НА ЦИТОТОКСИЧНУ ДІЮ ЕКСТРАКТУ
БОЛИГОЛОВА У ЛІМФОЦИТАХ ЛЮДИНИ

В.І. Музыка¹, Г.П. Македонов^{2*},
Л.В. Цховребова², І.В. Колоніна¹

¹ТОВ “УнгернІя”, Москва, Росія

²Інститут загальної генетики

ім. М.І.Вавилова, РАН, Москва, Росія.

В даній роботі досліджено вплив препарату Кантепарин на цитотоксичну дію спиртового екстракту болиголова (*Conium maculatum* з родини *Umbellifera*) на лімфоцитах людини. Було виявлено захисну дію препарату Кантепарин, яка проявляється як у зниженні загальної кількості клітин, що гинуть, так і в зменшенні частки некрозів і, відповідно, збільшенні частки апоптозів в спектрі індукованої загибелі клітин. Факт зниження частки некрозів найбільш важливий у випадку можливого застосування болиголова або інших хіміопрепаратів разом з препаратом Кантепарин в якості протипухлинних агентів.

Ключові слова: препарат Кантепарин, цитотоксична дія, екстракт болиголова, лімфоцити людини.

THE PROTECTIVE EFFECT
OF BIOTECHNOLOGICAL PREPARATION
“KANTEPARIN” ON THE CYTOTOXIC
ACTION OF BOLIGOLOV
(CONIUM MACULATUM) EXTRACT
IN HUMAN LYMPHOCYTES

V.I. Muzyka¹, G.P. Makedonov²,
L.V. Tskhovrebova², I.V. Kolonina¹

¹ООО “Ungernia”, Moscow;

²Vavilov Institute of General Genetics, RAS,
Moscow.

This article investigates the influence of the biotechnological preparation Kanteparin on cytotoxic effect of boligolov (*Conium maculatum*) extract in human lymphocytes. The protective effect of Kanteparin was found. These effect reveals both in lowering of total quantity of dying cells and in necrosis decrease and accordingly in apoptosis increase in spectrum of induced cell death. A part of necrosis decrease is more important in case of possible application of the boligolov or other chemotherapeutical agents alongside with Kanteparin as antitumor ones.

Key words: preparation Kanteparin, cytotoxic effect, boligolov extract, human lymphocytes.