

Свободные аминокислоты в лимфоцитах тимуса и селезенки после введения крысам экстракта куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.)

М.В. Горецкая*, С.С. Стугарева, Е.М. Дорошенко*, В.М. Шейбак***

**Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»*

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

В статье проведено сравнение фонда свободных аминокислот и их производных в лимфоцитах, выделенных из тимуса и селезенки у нормальных животных и после введения природного иммуномодулятора – экстракта куколок дубового шелкопряда. Установлено, что общее количество метаболитов аминокислот (включая небелковые аминокислоты) в лимфоцитах из вилочковой железы выше, чем в лимфоцитах из селезенки. Относительное количество серосодержащих аминокислот в лимфоцитах из тимуса и селезенки составляло около 20% от суммы протеиногенных аминокислот, но их абсолютное содержание в лимфоцитах из тимуса было вдвое больше. Уровни основных регуляторов белкового синтеза, каковыми являются аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (лейцин, изолейцин, валин), имеют более высокие значения в лимфоцитах из тимуса не только при абсолютном, но и при относительном сравнении с лимфоцитами из селезенки. Судя по величине соотношения цистеин/таурин происходит более энергичная наработка таурина в лимфоцитах из тимуса. Курсовое введение иммуномодулятора (экстракта куколок дубового шелкопряда) влияет на фонд свободных аминокислот и их производных в лимфоцитах, выделенных из центральных органов иммунной системы, тимуса и селезенки, сохраняя при этом специфичность воздействия на исследованные популяции лимфоцитов.

Ключевые слова: лимфоциты, тимус, селезенка, аминокислоты, экстракт куколок дубового шелкопряда.

Free amino acids in the lymphocytes of the thymus and spleen of rats after administration of oak silkworm pupae extract (*Antheraea pernyi* G.-M.)

M.V. Goretskay*, S.S. Stugareva, E.M. Doroshenko*, V.M. Sheybak***

**Educational establishment «Grodno State Medical University»*

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

The purpose of the study was to compare the free amino acids fund and their derivatives in lymphocytes isolated from thymus and spleen in normal animals and after administration of the natural immune modulator – extract of oak silkworm pupae. It has been found out that the total number of metabolites of amino acids (including non-protein amino acids) in lymphocytes from the thymus is higher than in lymphocytes from the spleen. Relative amount of sulfur-containing amino acids in the lymphocytes from the thymus and spleen was about 20% of the proteinogenic amino acids, but their absolute content in lymphocytes from the thymus was twice as high. Levels of the main regulators of protein synthesis, which are amino acids with branched carbon chain (leucine, isoleucine, valine), have higher values in lymphocytes from the thymus not only in absolute terms but also in relative comparison with lymphocytes from the spleen. Judging by the size ratio of cysteine / taurine there is more energetic time between taurine in lymphocytes from the thymus. A course introduction of immune modulator (an extract of oak silkworm pupae) affects the fund of free amino acids and their derivatives in lymphocytes isolated from the central organs of the immune system, thymus and spleen, while maintaining the specificity of the effect on the studied populations of lymphocytes.

Key words: lymphocytes, thymus, spleen, amino acids, extract of oak silkworm pupae.

Экстракт куколок дубового шелкопряда содержит большой набор биологически активных соединений. Гемолимфа куколок дубового шелкопряда является оптимальной биологической средой, позволяющей без вмешательства извне и потерь молекул сформировать новый организм. Она содержит высокие концентрации антиоксидантов и свободных аминокислот (до 15 г/л), и при введении в организм

высших животных обладает иммуномодулирующей активностью. Наличие высоких концентраций свободных аминокислот позволяет предположить, что длительное поступление экстракта куколок дубового шелкопряда в организм животных должно стимулировать обменные процессы в лимфоцитах, изменяя в том числе и уровень свободных аминокислот [1–2].

Целью работы явилось сравнение фонда свободных аминокислот и их производных в лимфоцитах, выделенных из тимуса и селезенки у нормальных животных и после введения природного иммуномодулятора – экстракта куколок китайского дубового шелкопряда.

Материал и методы. Крысам линии Вистар массой 60–70 г, получавшим полноценный рацион вивария, ежедневно внутрижелудочно вводили водный экстракт куколок китайского дубового шелкопряда [3] в разведении 1:10 в течение 10 дней в дозе 1 мл (70 мкг суммы свободных аминокислот) на 100 г массы. Контрольные животные получали аналогичным способом физиологический раствор. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Выделяли тимус и селезенку, ткани тимуса и селезенки измельчали ножницами, тщательно растирали в тефлоновом гомогенизаторе. В градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,077 г/см³) выделяли лимфоциты.

Определение свободных аминокислот проводили в хлорнокислых экстрактах диализатов лимфоцитов методом обращеннофазной ВЭЖХ

с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) проводили методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм для триптофана). Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 7.0.

Результаты и их обсуждение. Выполненные нами исследования показали, что фонд свободных протеиногенных аминокислот в лимфоцитах тимуса (ЛТ) в 2 раза превышает таковой в лимфоцитах селезенки (ЛС). В ЛТ регистрировались более высокие уровни как заменимых, так и незаменимых аминокислот, при этом их соотношение было выше, чем в ЛС (табл. 1).

Таблица 1

Структура пула аминокислот в лимфоцитах селезенки и тимуса после курсового введения крысам экстракта куколок в течение 10 дней

Показатели	Селезенка		Тимус	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Сумма протеиногенных аминокислот (мкмоль/10 ⁶)	18,1±2,17	19,0±2,36	36,7±4,66*	40,6±5,72
Заменимые аминокислоты (ЗА) (мкмоль/10 ⁶)	9,7±1,12	10,9±1,22	24,1±2,68*	24,7±3,11
Незаменимые аминокислоты (НА) (мкмоль/10 ⁶)	8,4±1,09	8,1±1,07	12,6±1,64*	15,9±2,39
ЗА/НА	1,15±0,16	1,35±0,18	1,91±0,24*	1,55±0,20
АРУЦ/ААК	1,58±0,17	2,32±0,26 ⁺	1,93±0,29	1,97±0,27
Сумма производных аминокислот (мкмоль/10 ⁶)	9,3±1,35	10,9±1,47	17,3±2,28*	24,0±2,65
Соотношение производные/протеиногенные аминокислоты	1,95±0,29	1,74±0,25	2,1±0,20	1,7±0,15
Сумма серосодержащих аминокислот (мкмоль/10 ⁶)	3,76±0,45	5,71±0,72 ⁺	7,4±0,78*	9,8±1,22
% от суммы протеиногенных аминокислот	20,8%	30,1%	20,2%	24,2%
АРУЦ	1,55±0,21	2,2±0,28	4,08±0,37*	4,5±0,61
% от суммы протеиногенных аминокислот	8,6%	11,6%	11,1%	11,0%
% от суммы незаменимых аминокислот	18,5%	27,2%	32,4%	28,1%
Цистеин/Таурин	0,29±0,045	0,18±0,027	0,16±0,018*	0,70±0,081 ⁺

Примечание: * – достоверно (p<0,05) относительно контрольной группы ЛС.

⁺ – достоверно (p<0,05) соответствующей контрольной группы.

**Содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах тимуса и селезенки крыс
(мкмоль/10⁶) после курсового введения экстракта куколок китайского дубового шелкопряда**

Аминокислоты	Селезенка		Тимус	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Аспарат	1,91±0,40	3,00±0,49	4,09±0,15*	6,29±1,56
Глутамат	1,46±0,26	1,90±0,16	4,61±1,14*	5,37±1,41
Аспарагин	0,14±0,01	0,37±0,03 ⁺	0,80±0,15*	0,42±0,13 ⁺
Серин	1,22±0,16	1,10±0,09	2,88±0,68*	1,87±0,53
Глутамин	0,05±0,01	0,16±0,02 ⁺	0,17±0,05	0,30±0,11
Гистидин	0,21±0,04	0,16±0,01	0,38±0,09	0,34±0,09
Глицин	0,68±0,11	0,62±0,06	1,91±0,45*	1,49±0,39
Треонин	0,61±0,10	0,69±0,08	1,08±0,22	1,33±0,40
Аргинин	0,80±0,16	0,78±0,05	1,55±0,41	0,82±0,27
Аланин	1,76±0,19	1,53±0,16	3,39±0,78	4,35±1,28
Тирозин	0,38±0,06	0,43±0,03	1,08±0,33	0,96±0,35
Валин	0,54±0,09	0,53±0,11	1,01±0,24	1,25±0,38
Метионин	0,16±0,04	0,23±0,03	0,45±0,12*	0,34±0,12
Цистеин	0,76±0,19	0,81±0,16	0,93±0,41	3,81±1,85
Триптофан	0,03±0,005	0,03±0,003	0,16±0,03*	0,05±0,01 ⁺
Фенилаланин	0,57±0,08	0,49±0,03	0,87±0,24	1,26±0,50
Изолейцин	0,45±0,17	0,65±0,05	1,50±0,33*	1,37±0,48
Лейцин	0,56±0,07	1,02±0,17 ⁺	1,57±0,33*	1,85±0,50
Лизин	4,30±0,86	3,27±0,46	3,97±1,13	3,65±1,68
Пролин	1,51±0,20	1,25±0,26	4,29±0,76*	3,47±1,20

Примечание: * – достоверно (p<0,05) относительно контрольной группы ЛС.

⁺ – достоверно (p<0,05) соответствующей контрольной группы.

Таблица 3

**Непротеиногенные аминокислоты и производные свободных аминокислот
в лимфоцитах селезенки и тимуса после курсового введения крысам экстракта куколок
китайского шелкопряда (ЭКШ)**

Производные аминокислот	Селезенка		Тимус	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
α-аминоадипиновая кислота	0,06±0,01	0,18±0,02 ⁺	0,32±0,31	0,39±0,15
Фосфозаноламин	0,89±0,20	1,68±0,23 ⁺	0,59±0,33	2,30±0,55 ⁺
1-метилгистидин	0,025±0,004	0,01±0,006	0,03±0,01	0,03±0,009
Цитруллин	0,10±0,01	0,11±0,01	0,25±0,05*	0,23±0,07
β-аланин	0,056±0,01	0,05±0,006	0,16±0,07	0,23±0,11
Таурин	2,66±0,42	4,61±0,93	5,94±2,20	5,47±1,48
β-аминомасляная кислота	0,01±0,004	0,04±0,007	0,09±0,08	0,04±0,006
γ-аминомасляная ки- слота	0,07±0,01	0,06±0,007	0,18±0,06	0,32±0,13
α-аминомасляная кислота	0,03±0,007	0,06±0,02	0,03±0,01	0,10±0,05
Этанолламин	1,75±0,59	1,14±0,26	3,44±1,12	1,60±0,32
Цистатионин	0,18±0,04	0,06±0,01 ⁺	0,09±0,03	0,19±0,06
Гидроксипролин	0,08±0,01	0,11±0,006 ⁺	0,30±0,12	0,55±0,22
Орнитин	3,43±0,48	2,78±0,18	5,83±2,75	12,57±6,87

Примечание: * – достоверно (p<0,05) относительно контрольной группы ЛС.

⁺ – достоверно (p<0,05) соответствующей контрольной группы.

Соответственно, общее количество метаболитов аминокислот (включая не белковые аминокислоты) в ЛТ выше, чем в ЛС. Относительное количество серосодержащих аминокислот в ЛТ и ЛС составляло около 20% от суммы протеиногенных аминокислот, но их абсолютное содержание в ЛТ было вдвое больше. При этом уровни основных регуляторов белкового синтеза, каковыми являются аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (лейцин, изолейцин, валин), имеют более высокие значения в ЛТ не только при абсолютном, но и при относительном сравнении с ЛС. Судя по величине соотношения цистеин/таурин происходит более энергичная наработка таурина в ЛТ.

Изучение индивидуальных концентраций протеиногенных аминокислот показало, что в ЛТ достоверно выше уровни заменимых аминокислот аспартата, глутамата, серина, глицина и пролина, незаменимых – метионина, триптофана, лейцина и изолейцина (табл. 2). Уровень триптофана в ЛТ выше, в среднем, в 5 раз, тогда как остальных вышеперечисленных аминокислот – в 1,5–3 раза по сравнению со значениями в ЛС.

Несмотря на то, что суммарное количество производных протеиногенных аминокислот и небелковых аминокислот в ЛТ выше, достоверные изменения имели место только в отношении цитруллина (табл. 3). Однако, следует отметить, что выраженные тенденции к более высоким значениям в ЛТ имеют орнитин, гидроксипролин, ГАМК, таурин и β -аланин.

Курсовое введение животным экстракта куколок китайского дубового шелкопряда существенно увеличивало в ЛТ относительное количество цистеина, не оказывая выраженного воздействия на остальные анализируемые нами характеристики аминокислотного фонда. Одновременно, в ЛС увеличивалось соотношение АРУЦ/ААК и общее количество серосодержащих аминокислот (табл. 1).

Введение крысам экстракта куколок привело к увеличению содержания аспарагина, глутамина и лейцина в ЛС (табл. 2). В ЛТ наблюдали, по существу, противоположный эффект – почти в 2 раза уменьшались концентрации аспарагина и триптофана.

После введения экстракта как ЛТ, так и в ЛС увеличивалось содержание фосфотаноламина в 2 и 4 раза, соответственно, α -аминоадипиновой кислоты и гидроксипролина в ЛС, а также цитруллина в ЛТ (табл. 3). Одновременно в ЛС регистрировалось выраженное снижение уровня цистатионина, что, вероятно, отражает уси-

ние метаболизма метионина по пути транссульфирования, ведущее к наработке цистеина и таурина, аминокислот определяющих синтез различного типа цитокинов иммунокомпетентными клетками.

Интересным представлялся анализ концентрационного градиента протеиногенных аминокислот в лимфоцитах селезенки и тимуса. Обнаружено, что во всех фракциях лимфоцитов лимитирующими являются концентрации триптофана, глутамина, аспарагина, метионина и гистидина. Напротив, наиболее высокие концентрации в лимфоцитах регистрируются в отношении глутамата, пролина, аланина, аспарагина и лизина. Несмотря на введение экстракта, содержащего высокие количества свободных аминокислот, эти пять показателей сохраняют свои величины.

Ранее было показано наличие подобной системы концентрационного градиента для лимфоцитов крови и печени [4]. Таким образом, проведенные определения свободных аминокислот в лимфоцитах крови, печени, тимуса и селезенки однозначно доказывают наличие минимальных концентраций триптофана в исследуемых объектах. Ранее нами было показано наличие относительно низких концентраций аргинина в лимфоцитах крови и клеток, выделенных из печени [4], тем не менее, несмотря на известную роль в иммуномодуляции, уровень этой аминокислоты в лимфоцитах тимуса и селезенки, вероятно, не является лимитирующим.

Известно, что триптофан модулирует транспорт многих соединений, а его метаболиты оказывают существенные регуляторные эффекты, как в Т-, так и в В-лимфоцитах, и, вероятно, именно колебания данной свободной аминокислоты имеют определяющее значение для метаболизма в клетках иммунной системы [5–6].

Низкое содержание глутамина в лимфоцитах тимуса, возможно, объясняется отсутствием выраженной экспрессии глутаминсинтетазы по сравнению с другими тканями, в частности, в печени [7]. Ниже, чем в ткани печени, и активность гистидиндекарбоксилазы в лимфоцитах тимуса, что может отражаться на уровне гистамина в клетках иммунной системы [8].

Заключение. Таким образом, полученные данные подтверждают наличие стабильного концентрационного градиента в лимфоцитах, независимо от источника их выделения. Тем не менее, «homing»-эффект проявляется количественными различиями со стороны как протеиногенных аминокислот, так и их метаболитов.

Курсовое введение иммуномодулятора (экстракта куколок китайского дубового шелкопряда) влияет на фонд свободных аминокислот и их производных в лимфоцитах, выделенных из центральных органов иммунной системы, тимуса и селезенки, сохраняя при этом специфичность воздействия на исследованные популяции лимфоцитов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Горещкая, М.В. Влияние экстракта куколок шелкопряда на функциональную активность нейтрофилов / М.В. Горещкая [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 2. – С. 25–30.
2. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Ученые за-

- писки «УО ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 248–265.
3. Трокоз, В.А. Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).
 4. Шейбак, В.М. Спектр свободных протеиногенных аминокислот в лимфоцитах / В.М. Шейбак [и др.] // Журнал ГрГМУ. – 2008. – № 3. – С. 62–66.
 5. Li, P. Amino acids and immune function / P. Li [и др.] // Br. J. Nutr. – 2007. – Vol. 98, № 2. – P. 237–252.
 6. Mellor, A.L. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity / A.L. Mellor [et al.] // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170, № 2. – P. 5809–5813.
 7. Newsholme, P. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease / P. Newsholme [et al.] // J. Nutr. Biochem. – 1999. – Vol. 10, № 6. – P. 316–324.
 8. Roth, E. Immune and cell modulation by amino acids / E. Roth // Clin. Nutr. – 2007. – Vol. 26, № 5. – P. 535–544.

Поступила в редакцию 30.06.2011. Принята в печать 30.08.2011

Адрес для корреспонденции: 210038, г. Витебск, Московский пр-т, д. 33, УО «ВГУ им. П.М. Машерова», кафедра химии – Стугарева С.С.