

УДК 577.3

## Реакции изолированных клеток на действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда

А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.М. Шейбак, М.В. Горецкая,  
Е.М. Дорошенко, Т.А. Толкачева

*Целью работы явилось изучение реакций изолированных нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов на введение гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда. Установлено, что малые дозы водного экстракта куколок дубового шелкопряда активируют антиоксидантный эффект нейтрофилов, а относительно высокие дозы стимулируют фагоцитоз макрофагами и модулируют метаболизм и функции тканевых лимфоцитов.*

В гемолимфе куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.), находящихся в диапаузе 7–8 месяцев, содержатся вещества, необходимые для формирования эукариотического организма – бабочки, а также вещества, обеспечивающие антиоксидантное и бактериостатическое действие, что препятствует повреждению молекул, из которых формируется новый организм бабочки. Эта фундаментальная биохимическая особенность жизненного цикла дубового шелкопряда может использоваться при создании антиоксидантных и бактериотропных препаратов для других эукариотических организмов *in vivo* и увеличения сроков хранения биологических субстанций *in vitro*. Для теоретического обоснования правомерности такого подхода необходимо провести исследование действия компонентов гемолимфы куколок на метаболизм и функции изолированных клеток, в частности, нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов.

Известно, что основной функцией нейтрофилов является фагоцитоз чужеродных объектов. При фагоцитозе происходит усиление обмена веществ по пентозофосфатному пути обмена углеводов с активацией внутриклеточного дыхания (респираторного взрыва). Нейтрофилы быстро отвечают на различные раздражители и активируются под влиянием фагоцитированных частиц или клеток, агрегированных иммуноглобулинов, иммунных комплексов, компонентов комплемента, хемокина ИЛ-8, лектинов и других митогенов [1]. Поскольку куколки дубового шелкопряда являются эффективным источником многих биологически активных веществ [2, 3, 4], целью первого этапа работы было изучение влияния экстракта куколок китайского дубового шелкопряда на функциональную активность нейтрофилов.

Окислительный стресс вызывается активными формами кислорода и азота. Этот процесс лежит в основе клеточной патологии за счет стимуляции пероксидного окисления мембранных липидов. Процессы окислительного стресса играют положительную роль

при обезвреживании нейтрофилами микроорганизмов (фагоцитоз), но они могут участвовать в повреждении собственных клеток организма. Поэтому целью второго этапа работы было изучение влияния нативного жидкого содержимого куколок (НЖСК) дубового шелкопряда на процессы генерации активных кислородных метаболитов (АКМ) и секреторную дегрануляцию нейтрофилов крови человека при активации клеток в условиях *in vitro*.

Известно, что пул SH-содержащих соединений в клетках иммунокомпетентных тканей влияет на общее состояние иммунитета [5]. В этой связи, повышение продукции тиолов (цистеин, восстановленный глутатион) является отличительной чертой иммунного ответа *in vivo*. Роль свободных аминокислот в функционировании системы иммунитета заключается: 1) в активации Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных киллеров и макрофагов; 2) в сохранении клеточного редокс-потенциала; 3) экспрессии генов и пролиферации лимфоцитов; 4) продукции антител, цитокинов и других цитотоксических соединений. В связи с этим целью третьего этапа работы явилось изучение влияния курсового введения экстракта куколок дубового шелкопряда крысам на уровень серосодержащих аминокислот в лимфоцитах, выделенных из печени, селезенки и тимуса активно растущих животных.

Некоторые исследователи относят печень к органам системы иммунитета, поскольку обогащенная антигенами кровь из желудочно-кишечного тракта проходит через ее сеть синусоидов, где сканируется антиген-презентирующими клетками и лимфоцитами. Популяция печеночных лимфоцитов селективно обогащена отдельными фракциями лимфоцитов, которые играют важную роль в иммунной защите против приносимых антигенов. Циркулирующие в синусоидах печени лимфоциты вступают в тесный контакт с антигенами, находящимися на эндотелиальных клетках, купферовских клетках и печеночных резидентных дендритных клетках. Поскольку эндотелий синусоидов фенестрирован и отсутствует базальная мембрана, лимфоциты могут контактировать непосредственно с гепатоцитами [7–9]. В связи с вышеизложенным целью четвертого этапа работы было подтверждение предположения о том, что длительное поступление гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда в организм животных должно стимулировать обменные процессы в лимфоцитах, изменяя, в том числе, количество свободных аминокислот.

**Материал и методы.** При выполнении первого этапа работы были использованы экстракт из цельных куколок дубового шелкопряда, приготовленный согласно разработанной инструкции (ЭК) [3] и водный экстракт из гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда (ГЛ). Оба препарата не содержат белков; ЭК дозируется разведением, а ГЛ дозируется содержанием суммы аминокислот в 1 мл препарата. Были проведены эксперименты *in vitro* и *in vivo*.

Опыты *in vitro*: в круглодонных пластиковых планшетах инкубировали в течение часа в равных объемах цельную кровь, ЭК или ГЛ и взвесь стафилококка (однодневная культура *Staphylococcus aureus* P-209). ЭК добавляли в разведениях: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, а ГЛ – в дозах 0,1 мкг/мл и 0,01 мкг/мл. В контрольные пробы вместо экстракта вносили физиологический раствор. После инкубации готовили мазки крови, окрашенные по Романовскому-Гимзе. Производили подсчет числа нейтрофилов,

захвативших в процессе фагоцитоза три и более стафилококков (фагоцитарное число – ФЧ в процентах), и количество поглощенных стафилококков каждым нейтрофилом (фагоцитарный индекс – ФИ).

Опыты *in vivo*: 1. В эксперименте за трое суток до декапитации крысам-самкам массой 180–200 г однократно внутрибрюшинно вводили ГЛ в дозе 100 мг/кг. За 2–3 мин перед завершением эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили 10 мл раствора Хенкса с гепарином. Отбирали перитонеальную жидкость с резидентными и мигрировавшими в очаг стерильного воспаления клетками. Для исследования брали кровь с гепарином (25 Ед/мл) и перитонеальную жидкость. Через 60 мин оценивали фагоцитарное число и фагоцитарный индекс. 2. ГЛ вводили внутривентрикулярно в дозе 100 мг/кг, один раз в день в течение 10 суток крысам массой 55–75 г. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом через 24 ч после заключительного введения экстракта. Для исследования брали кровь с гепарином (25 Ед/мл). Через 60 мин определяли фагоцитарное число и фагоцитарный индекс. 3. ЭК вводили двукратно с суточным интервалом внутривентрикулярно в разведении 1:10 и объеме 1 мл/200 г массы тела. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом через 24 ч после заключительного введения экстракта. Для исследования брали кровь с гепарином (25 Ед/мл). Через 60 мин определяли фагоцитарное число, фагоцитарный индекс и ставили НСТ-тест.

Для выполнения второго этапа работы выделяли *нейтрофилы крови человека*, для чего стабилизированную гепарином кровь перемешивали из расчета 5:1 с 7% раствором декстрана-500 в 0,15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре для седиментации эритроцитов. В пробирки наливали по 3 мл фиколл-урографина, на который осторожно наслаивали по 9 мл плазмы с лейкоцитами, и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 об/мин для разделения лейкоцитов по плотности. После центрифугирования надосадочную жидкость и слой мононуклеаров удаляли, к осадку, содержащему фракцию гранулоцитов, добавляли 1 мл ледяной дистиллированной H<sub>2</sub>O, перемешивали в течение 20 с для гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов, после чего восстанавливали осмотическую активность раствором добавлением 1 мл 0,3 моль/л NaCl. Затем клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в жидкости Эрла при pH 7,3. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96%.

*Повреждение нейтрофилов* исследовали по высвобождению из клеток в инкубационную среду цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Нейтрофилы ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли НЖСК и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость собирали. В образцах внеклеточной жидкости определяли активность ЛДГ кинетическим методом. Кинетический метод определения каталитической активности ЛДГ основан на ферментативной реакции взаимодействия пирувата и НАДН с образованием лактата и НАД<sup>+</sup>. Уменьшение концентрации НАДН в образцах за 1 мин, детектируемое по изменению оптической плотности образцов на длине волны 340 нм ( $\Delta D$ ), пропорционально активности ЛДГ (A):  $A = \Delta D \cdot 8600$  [мкмоль  $\cdot$  мин<sup>-1</sup>  $\cdot$  л<sup>-1</sup>].

Полученные значения выражали в процентах от общей активности ЛДГ нейтрофилов ( $A_0$ ), которую оценивали после обработки клеток 0,1% раствором Triton X-100. Высвобождение ЛДГ в % ( $A_{\text{отн}}$ ) определяли по формуле:  $A_{\text{отн}} = A \cdot 100 \% / A_0$ .

*Генерация нейтрофилами АКМ.* Суспензию нейтрофилов ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) помещали в стеклянную кювету, добавляли НЖСК, люминол ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) или люцигенин ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и исследовали параметры усиленной люминолом (Люм-) или люцигенином (Люц-) хемилюминесценции (ХЛ), обусловленной генерацией нейтрофилами АКМ при активации клеток в процессе адгезии к стеклу. Через 10 мин в образцы вносили fMLP ( $7,5 \cdot 10^{-7}$  моль/л), затем спустя 5 мин добавляли латекс (50 мкл разбавленной 1:50 базовой суспензии латекса для определения ревматоидного фактора) и определяли параметры ХЛ, обусловленной образованием АКМ при действии fMLP и фагоцитозе клетками латекса. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ активированных клеток регистрировали с помощью компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, РБ) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», РБ). Интегральную интенсивность ХЛ клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за время измерения 10 мин при адгезии или за время 4 мин при действии латекса или fMLP. Ингибиторный эффект выражали в процентах.

*Влияние НЖСК на реакции окисления, катализируемые миелопероксидазой нейтрофилов.* Нейтрофилы ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) разрушали добавлением 0,1% раствора Triton X-100. При этом миелопероксидаза (МПО) переходила в среду и становилась доступной для реакций, что позволяло исследовать влияние НЖСК на реакции, катализируемые МПО. В кювету хемилюминометра помещали суспензию разрушенных нейтрофилов, НЖСК, люминол ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л),  $H_2O_2$  ( $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и оценивали скорость окисления люминола пероксидом водорода, катализируемое МПО хемилюминесцентным методом. Для этого регистрировали кинетические зависимости интенсивности ХЛ, а затем рассчитывали интегральную интенсивность ХЛ за 1,5 мин. Ингибиторный эффект выражали в процентах.

*Секреторная дегрануляция азурофильных гранул нейтрофилов.* Суспензии нейтрофилов ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли НЖСК, fMLP ( $7,5 \cdot 10^{-7}$  моль/л) и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Нейтрофилы при адгезии на стекло и действии fMLP активируются и секретируют МПО во внеклеточную среду. По окончании инкубирования надосадочную жидкость собирали и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g для осаждения неадгезировавших клеток. В полученных образцах внеклеточной жидкости определяли уровень активности МПО, секретированной клетками, по интенсивности ХЛ, индуцированной добавлением люминола ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и  $H_2O_2$  ( $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Полученные значения выражали в процентах от общего уровня активности МПО в нейтрофилах.

При выполнении третьего этапа работы крысам линии Вистар массой 60–70 г ежедневно внутрижелудочно вводили водный экстракт куколок дубового шелкопряда, полученного по способу, описанному В.А. Трокоз и соавт. [4], в разведении 1:10 в дозе 1 мл/100 г массы тела на протяжении 10 дней. Контрольные животные получали аналогичный объем физиологического раствора. Животных декапитировали под легким

эфирным наркозом. Выделяли селезенку, тимус и печень. Ткани печени, селезенки и тимуса измельчали ножницами, тщательно растирали в тефлоновом гомогенизаторе. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,077 г/см<sup>3</sup>). 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). Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 27°C. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01.

Для реализации четвертого этапа работы крысам линии Вистар массой 60–70 г, ежедневно внутрижелудочно вводили водный экстракт куколок китайского дубового шелкопряда в разведении 1:10 в дозе 1мл/100 г массы на протяжении 10 дней. Контрольные животные получали аналогичным способом физиологический раствор. Животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Ткань печени измельчали ножницами, тщательно растирали в тефлоновом гомогенизаторе. В градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,077 г/см<sup>3</sup>) 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). Условия определения: колонка Диасорб 130 С<sub>16</sub>T, 3x150 мм; подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер pH 5,7/50% метанол – 100/54 (об/об). Скорость потока 0,8 мл/мин, температура колонки 30°C. Дериватизация: смешивание пробы с 5 объемами 0,4% раствора о-фталевого альдегида и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислоты в 0,4 М Na-боратном буфере, pH 9,4, затем нейтрализация добавлением равного объема 0,1 М хлорной кислоты. 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). Условия определения: колонка Сепарон SGX C<sub>18</sub>, 8 мкм, подвижная фаза: 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 мМ CH<sub>3</sub>COOH, 20 мг/л ЭДТА, 180 мг/л октилсульфоната натрия, 230 мг/л гептилсульфоната натрия. Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 27°C. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01.

*Статистическую обработку* результатов проводили с использованием программы Statistica 7.0. На рисунках представлены средние значения (M) и доверительные интервалы (при p = 0,95).

**Результаты и их обсуждение.** *Первый этап работы – фагоцитарная активность нейтрофилов.* Известно, что аминокислоты оказывают иммуномодулирующее действие на отдельные показатели системы иммунитета. Так, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, триптофан обладают достаточно выраженными иммуностимулирующими свойствами. Лизин, лейцин, аргинин стимулируют фагоцитоз. Ранее было показано, что гемолимфа куколок шелкопряда содержит свободные аминокислоты в концентрации 15 г/л. В табл. 1 представлены данные об изменении фагоцитарной активно-

сти нейтрофилов крови при культивировании *in vitro* с дозами гемолимфы (ГЛ) 0,1 мкг/мл и 0,01 мкг/мл и водного экстракта (ЭК) в различных разведениях.

Из табл. 1 видно, что достоверное повышение величин фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса получено при введении в инкубационную среду гемолимфы в концентрации 0,1 мкг/мл или экстракта в разведениях 1:10 и 1:100.

Таблица 1

**Фагоцитарная активность нейтрофилов крови при культивировании *in vitro* с различными дозами нативного экстракта гемолимфы куколок**

Группы	ФЧ, %			ФИ, у.е.		
	M±m	min	max	M±m	min	max
Гемолимфа						
Контроль	68,2±1,77	63	74	7,92±0,74	6,3	10,2
ГЛ 0,1 мкг/мл	83,2±2,96*	75	90	13,0±1,24*	8,8	15,7
ГЛ 0,01 мкг/мл	73,0±2,72	66	81	8,46±0,42	7,3	9,9
Экстракт						
Контроль	82,1±0,91	79,0	86,0	10,3±0,32	9,3	11,5
ЭК 1:10	88,3±1,76*	78,0	95,0	14,7±0,66*	11,7	17,5
ЭК 1:100	90,9±1,23*	87,0	96,7	13,5±0,75*	10,6	16,7
ЭК 1:1000	84,1±1,97	75,0	92,0	11,9±1,05	7,5	17,6
ЭК 1:10000	78,8±2,14	74,0	84,0	9,90±0,76	8,5	11,5

В табл. 2 представлены данные по функциональной активности нейтрофилов крови и перитонеальной жидкости крыс. На 4-е сутки, после однократного внутрибрюшинного введения гемолимфы, при оценке фагоцитарной активности отмечено достоверное увеличение фагоцитарного числа на 20% по сравнению с контрольными значениями. Одновременно наблюдали достоверное повышение фагоцитарного индекса на 70%.

Таблица 2

**Фагоцитарная активность нейтрофилов после однократного внутрибрюшинного введения ГЛ в дозе 100 мг/кг.**

Параметры	ФЧ, %			ФИ, у.е.		
	M±m	min	max	M±m	min	max
Нейтрофилы крови						
Контроль	69,6±1,43	65	73	8,24±0,37	7	9,3
Опыт	83±1,92*	76	87	14,0±0,87*	11,4	16,3
Нейтрофилы перитонеальной жидкости						
Контроль	65,8±2,10	62	73	6,18±0,52	4,6	7,2
Опыт	59,0±2,08*	55	62	4,90±0,47*	4,2	5,8

В перитонеальных фагоцитах отмечали выраженную тенденцию к снижению фагоцитарного индекса на 21% и фагоцитарного числа на 10%. Следовательно, однократное внутрибрюшинное введение гемолимфы крысам вызвало разнонаправленный эффект в отношении функциональной активности циркулирующих и мигрировавших нейтрофилов.

В дальнейших исследованиях изучали фагоцитарную активность нейтрофилов крови после десятикратного введения гемолимфы в дозе 100 мг/кг. В результате эксперимента отметили достоверное увеличение как фагоцитарного числа на 23%, так и фагоцитарного индекса на 34% по сравнению с контрольными значениями.

В последующих экспериментах была проведена обработка нейтрофилов животных контрольной группы экстрактом *in vitro* в разведении 1:10 (табл. 3). В результате количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе повысилось на 20% по сравнению с контролем, а их поглотительная способность увеличилась на 36%. Эти эксперименты позволяют сделать заключение о том, что экстракт в разведении 1:10 оказывает стимулирующее действие на нейтрофилы крови как в тестах *in vitro*, так и *in vivo*.

Введение экстракта в разведении 1:10 внутрибрюшинно один раз в сутки через день привело к достоверному увеличению функциональной активности нейтрофилов крови. Так, фагоцитарное число повысилось на 15%, фагоцитарный индекс возрос на 46% и поглотительный коэффициент увеличился на 43% относительно контрольных значений. Функциональная активность фагоцитов перитонеальной жидкости фактически не изменилась; можно даже отметить тенденцию к снижению фагоцитарного индекса на 29%.

Метаболическую активность нейтрофилов определяли в тесте восстановления нитросинего тетразолия. Известно, что НСТ-тест характеризует степень активации пентозофосфатного пути обмена углеводов и связанное с ним образование свободных радикалов кислорода. Спонтанный НСТ-тест отражает степень функциональной активности клеток *in vivo*, а индуцированный – функциональный резерв клетки, позволяя судить о нарушениях в бактерицидной системе фагоцитов.

Таблица 3

**Влияние экстракта куколок на функциональную активность нейтрофилов крови и перитонеальной жидкости *in vitro* и *in vivo***

Показатели	Нейтрофилы крови		
	Контроль	ЭК, <i>in vitro</i>	ЭК, <i>in vivo</i>
ФЧ, %	76,0±2,00	91,0±3,00*	87,0±1,52*
ФИ, у.е.	10,1±0,15	13,6±0,75*	14,7±1,21*
Показатели	Нейтрофилы перитонеальной жидкости		
	контроль	ЭК, <i>in vitro</i>	ЭК, <i>in vivo</i>
ФЧ, %	79,5±3,50	88,0±4,51	73,7±2,40
ФИ, у.е.	11,4±1,20	11,7±0,63	8,06±0,52

В табл. 4 представлены данные изменения спонтанной и стимулированной зимозаном реакции при введении экстракта внутрибрюшинно. Очевидно, что экстракт способствовал достоверному повышению как спонтанной, так и стимулированной реакции.

Таблица 4

**Влияние внутрибрюшинного введения экстракта куколок на метаболическую активность нейтрофилов крови в НСТ-тесте *in vivo***

Показатели	Контроль	ЭК
Спонтанная реакция	0,068±0,006	0,088±0,002*
Стимулированная реакция	0,101±0,006	0,137±0,008*
Коэффициент стимуляции	1,470±0,042	1,600±0,057

В тестах *in vitro* экстракт практически не уступал препарату сравнения – зимозану (табл. 5), то есть повышал функциональную активность нейтрофилов крови.

Таблица 5

**Влияние экстракта куколок *in vitro* на метаболическую активность нейтрофилов крови в НСТ-тесте *in vitro***

Показатели	M±m	min	max
Спонтанная реакция	0,068±0,006	0,059	0,096
Стимулированная реакция ЗМ	0,101±0,006*	0,087	0,147
Стимулированная реакция ЭК	0,099±0,004*	0,078	0,116
Коэффициент стимуляции ЗМ	1,470±0,042	1,30	1,70
Коэффициент стимуляции ЭК	1,480±0,071	1,10	1,80

**Примечание.** ЗМ – зимозан.

Таким образом, гемолимфа и экстракт куколок дубового шелкопряда оказывают иммуномодулирующее действие на клетки иммунной системы. Эффект отмечается как в тестах *in vitro*, так и в тестах *in vivo*. Положительный результат *in vivo* наблюдали при различных способах введения – внутрижелудочном и внутрибрюшинном. Очевидно, что экстракт куколок стимулирует функциональную активность нейтрофилов крови и одновременно подавляет активность нейтрофилов перитонеальной полости. В этом проявляется модулирующий эффект экстракта. Не обнаружены принципиальные различия в действии экстракта, приготовленного двумя способами и содержащего различные компоненты куколок.

*Второй этап работы – нейтрофилы и окислительный стресс.* Нейтрофилы формируют АКМ в процессе воспаления при активации под действием хемотаксических агентов (бактериальных пептидов, интерлейкина-8, лейкотриенов), при действии адгезионных молекул – лектинов, интегринов, иммуноглобулинов, при адгезии на эндотелий, фибронектин, а также непосредственно в ходе фагоцитоза микроорганизмов и частиц. Были выбраны модели, где в качестве активирующих воздействий использованы синте-

тический хемотаксический пептид fMLP, частицы латекса, индуцирующие фагоцитарную активность нейтрофилов, и стеклянная подложка в качестве адгезионного субстрата.

На рис. 1 показаны кинетические зависимости интенсивности Люм-ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на поверхность стекла (1, 1'), при внесении fMLP (2, 2') и латекса (3, 3'). Возникающее свечение является следствием взаимодействия люминола с АКМ ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $^1O_2$ ,  $OCI^-$ ,  $ONOO^-$ ), генерируемыми активируемыми нейтрофилами. Зависимости 1–3 были получены в отсутствие НЖСК, а кривые 1'–3' при добавлении в клеточную суспензию 2 мкл, разбавленного в 20 раз НЖСК, на 1 мл суспензии. Как видно из рис. 1, при добавлении НЖСК дубового шелкопряда происходит снижение выхода АКМ как в случае активации клеток в ходе адгезии, так и при воздействии fMLP и латекса.

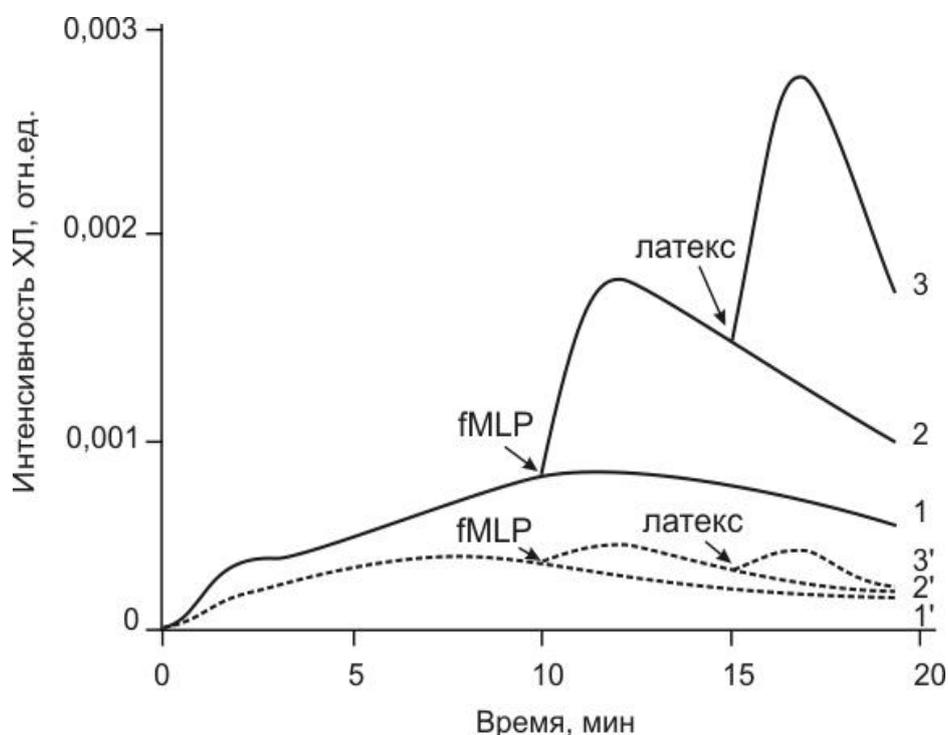


Рис. 1. Кинетические зависимости Люм-ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на поверхность стекла (1, 1'), при внесении fMLP (2, 2') и латекса (3, 3'). 1, 2, 3 — в отсутствие НЖСК, 1', 2', 3' — при добавлении 2 мкл НЖСК, разбавленного в 20 раз, на 1 мл суспензии клеток (конечная степень разбавления -  $10^3$  раз).

На рис. 2 приведены данные, характеризующие величину ингибиторного эффекта НЖСК в зависимости от количества вносимого препарата. Обнаружено, что ингибирующий эффект НЖСК в отношении генерации клетками АКМ, вызванной действием латекса и fMLP (рис. 2, кривые 2, 3), значительно выше, чем в отношении активации клеток в ходе адгезии на стекло (рис. 2, кривая 1). Выход АКМ, генерируемых при адгезии, снижается на 50% при количестве НЖСК в среде, соответствующем разбавлению в 500 раз, а при воздействии на нейтрофилы fMLP и латекса снижение выхода АКМ на 50% наблюдается при разбавлении НЖСК более, чем в  $10^4$  раз.

В нейтрофилах за генерацию АКМ ответственны, в первую очередь, НАДФН-оксидаза и миелопероксидаза (МПО, КФ 1.11.1.7). Активация мембраноассоциированных НАДФН-оксидазных комплексов обуславливает образование в нейтрофилах  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , которые формируются и атакуют субстраты у наружной поверхности клеток и внутри фагосом. Хорошо изученным хемилюминесцентным индикатором формирования  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  является люцигенин. С целью уточнения мишеней действия НЖСК было изучено его влияние на Люц-ХЛ нейтрофилов. Установлено, что НЖСК дубового шелкопряда не оказывает значительного влияния на интенсивность Люц-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии, при действии латекса и fMLP. Разница между Люм-ХЛ и Люц-ХЛ характеризует участие в генерации АКМ миелопероксидазы, поскольку люцигенин, в отличие от люминола, не окисляется МПО, не взаимодействует с ОСГ и другими продуктами МПО. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии НЖСК на МПО-зависимую генерацию АКМ нейтрофилами.

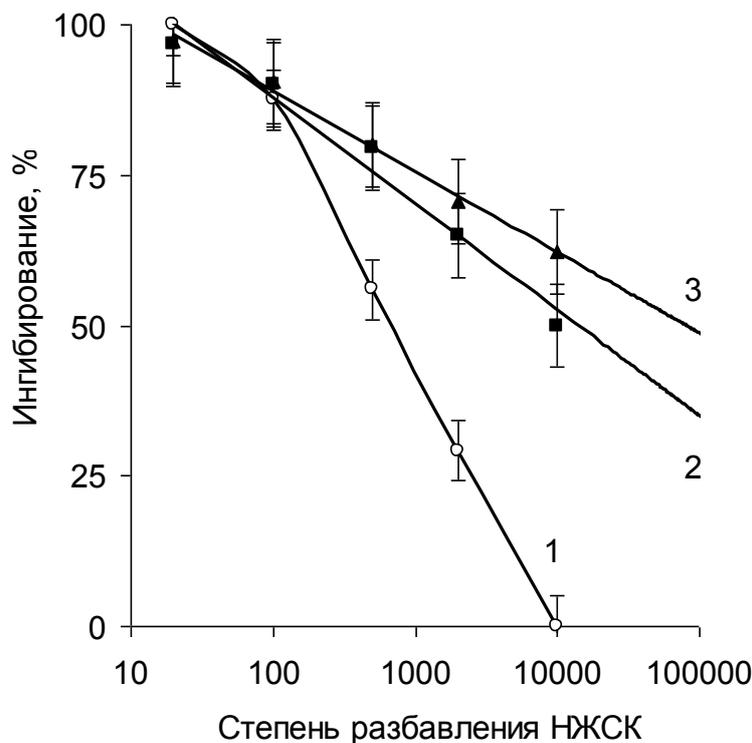


Рис. 2. Ингибирующий эффект НЖСК дубового шелкопряда на Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии (1), действии fMLP (2) и латекса (3) в зависимости от степени разбавления НЖСК. Указана конечная степень разбавления препарата при его внесении в суспензию клеток.

На рис. 3 представлена зависимость, характеризующая влияние НЖСК на окисление люминола пероксидом водорода в присутствии МПО разрушенных нейтрофилов. Как и в случае цельных жизнеспособных нейтрофилов, при действии на фермент МПО разрушенных клеток препарат НЖСК также ингибировал способность МПО катализи-

ровать окисление люминола. Ингибирование на 50% наблюдается при добавлении НЖСК в количестве, соответствующем разбавлению более чем в  $10^4$  раз. Следовательно, компоненты НЖСК могут напрямую влиять на МПО-зависимые реакции.

МПО в покоящихся нейтрофилах локализована в азурофильных лизосомальных гранулах и вовлекается в процессы генерации АКМ только после высвобождения из гранул при активации клеток. МПО, секретированная из нейтрофилов во внеклеточное пространство, может приводить к окислительной модификации белков, липидов и прочих веществ на удалении от клетки, что обуславливает важность процесса секреторной дегрануляции.

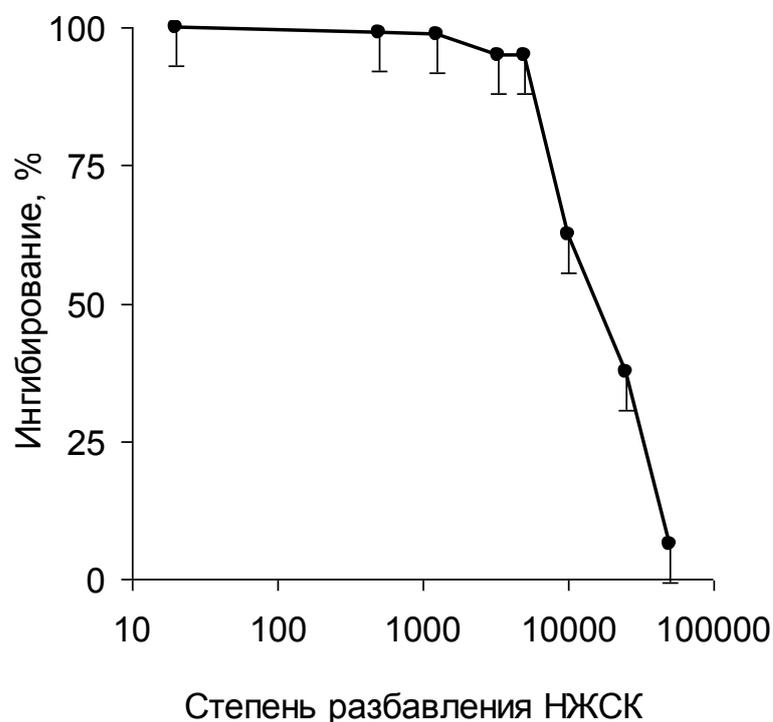


Рис. 3. Зависимость ингибирующего действия НЖСК на Люм-ХЛ в системе «люминол +  $H_2O_2$  + МПО разрушенных нейтрофилов» от степени разбавления НЖСК. Указана конечная степень разбавления препарата при его внесении в суспензию.

На рис. 4 показано влияние НЖСК на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии на стекло и при действии fMLP. Клетки были проинкубированы в течение 1 ч при  $37^\circ C$  в отсутствие или присутствии НЖСК, а затем проведена оценка высвобождения МПО во внеклеточную среду в процентах по отношению к полному содержанию МПО в нейтрофилах. Как видно из рис. 4, НЖСК тормозит секрецию МПО во внеклеточную среду и при активации клеток в процессе адгезии, и при действии fMLP. По-видимому, влияние НЖСК на процессы активации кислорода в нейтрофилах не ограничиваются прямым взаимодействием НЖСК с МПО и ее продуктами, но и включают супрессивное действие на процессы активации нейтрофилов.

Поскольку выход ферментов из клеток и инактивация клеток могут происходить в результате клеточной гибели, в работе изучено повреждение нейтрофилов при действии НЖСК по высвобождению ЛДГ. ЛДГ является цитозольным ферментом и может оказываться во внеклеточной среде только вследствие нарушения барьерной функции плазматической мембраны клетки. Проведенные исследования показали, что НЖСК в использованных концентрациях не приводит к усилению высвобождения из нейтрофилов ЛДГ и, следовательно, не вызывает разрушения нейтрофилов по механизму некроза.

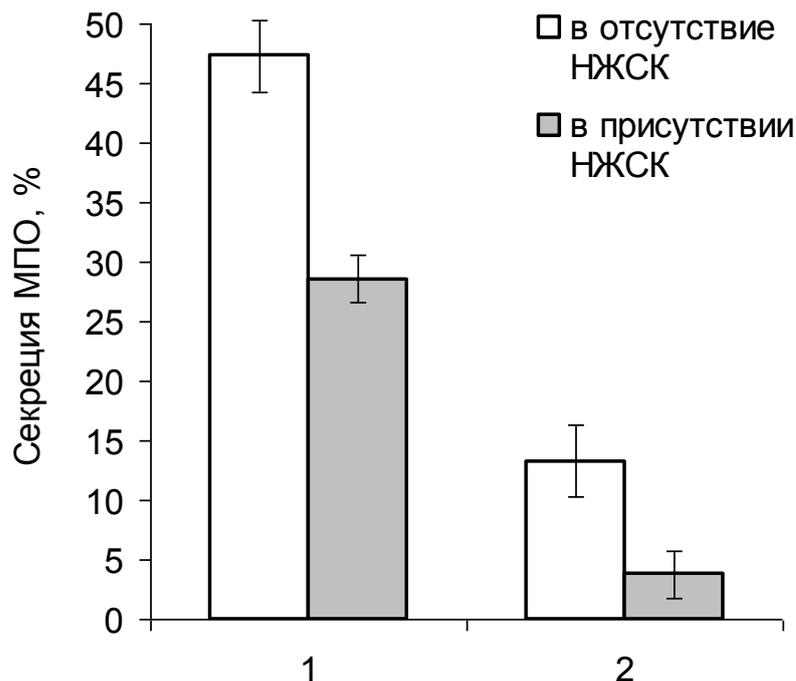


Рис. 4. Влияние НЖСК на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток в процессе адгезии (1) и при действии fMLP (2).

Важными внутриклеточными ферментами, регулирующими процессы сборки НАДФН-оксидазных комплексов, дегрануляции нейтрофилов, а также гибели нейтрофилов по механизму апоптоза, являются фосфатидил-инозитол-3-киназа (ФИ-3-К) и 5-липоксигеназа (5-ЛО). Была изучена зависимость действия НЖСК на генерацию нейтрофилами АКМ от ингибиторов 5-ЛО и ФИ-3-К. На рис. 5 показаны данные, отражающие ингибирующее действие НЖСК на Люм-ХЛ нейтрофилов в отсутствие и присутствии в среде МК-886 (блокатор активации 5-ЛО) и LY294002 (ингибитор ФИ-3-К) в случае активации клеток при адгезии и действии fMLP. Как видно из рис. 5, ингибирующий эффект НЖСК на генерацию АКМ при действии fMLP слабо зависит от МК-886 и LY294002. В то же время ингибирующее действие НЖСК на образование АКМ при активации нейтрофилов в процессе адгезии значительно снижается при блокировании 5-ЛО и ФИ-3-К. Такой результат подтверждает, что действие НЖСК не ограничивается лишь влиянием на активность МПО и включает изменение процессов внутриклеточной сигнализации.

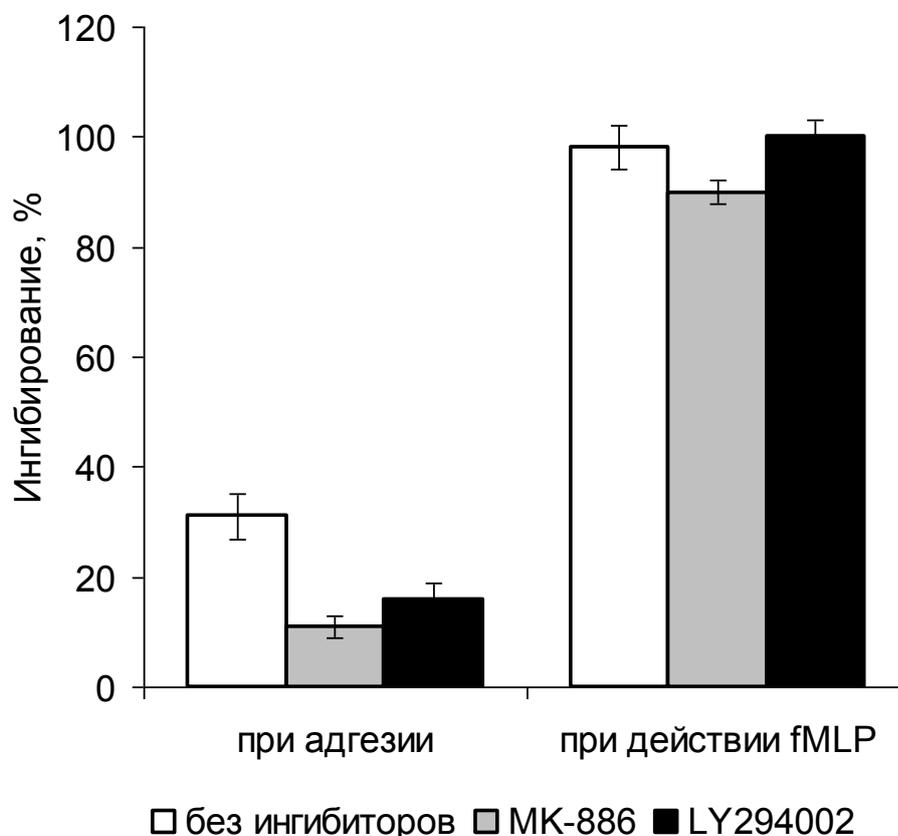


Рис. 5. Ингибирующий эффект НЖСК в отношении Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в отсутствие и присутствии МК-886 ( $2 \cdot 10^{-6}$  моль/л) и LY294002 ( $1,7 \cdot 10^{-7}$  моль/л).

Полученные на данном этапе работы данные позволили сделать следующие выводы. НЖСК дубового шелкопряда приводит к ингибированию процессов генерации нейтрофилами АКМ путем непосредственного ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции из нейтрофилов МПО во внеклеточную среду. Ингибирующий эффект в отношении образования нейтрофилами АКМ при действии латекса и fMLP многократно превышает величину воздействия НЖСК на активацию нейтрофилами кислорода при адгезии. Действие НЖСК на нейтрофилы частично зависит от функционирования 5-ЛО и ФИ-3-К внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток.

*Третий этап работы – лимфоциты и серосодержащие аминокислоты.* Известно, что активация метаболических процессов, сопровождаемая интенсификацией синтеза протеинов, приводит к падению содержания свободных незаменимых аминокислот, в том числе метионина, в клетках [6]. В проведенном эксперименте курсовое введение растущим животным экстракта куколок шелкопряда вызывало резкое падение уровня свободного метионина в лимфоцитах, выделенных из ткани печени (табл. 6).

Таблица 6

**Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс,  
выделенных из ткани печени (мкмоль/млн клеток)**

Аминокислоты	Контроль	Опыт
Метионин	4,44±0,53	0,51±0,08*
Цистатионин	0,07±0,009	0,82±0,19*
Цистеин	0,49±0,04	4,27±0,79*
Таурин	1,64±0,11	3,20±0,93
Метионин/цистеин	9,1±0,98	0,12±0,014*
Цистатионин/цистеин	0,14±0,016	0,19±0,023
Цистеин/таурин	0,30±0,042	1,33±0,139*

Метионаденозилтрансфераза II (МАТ II) является ключевым ферментом клеточного метаболизма и катализирует образование S-аденозилметионина из метионина и АТФ. Нормальные покоящиеся Т-лимфоциты имеют минимальную активность МАТ II, тогда как активированные пролиферирующие лимфоциты и трансформированные Т-клетки демонстрируют повышенную активность МАТ II. Этот механизм захватывает прокаспазу-8 и как следствие повышения активности каспазы-8 снижается уровень с-FLIP. Fas-индуцированный путь через торможение МАТ II влияет на метаболизм в митохондриях, что неизбежно ведет к активации каспазы-3 и фрагментации ДНК в клетке. Показано, что бластные клетки утилизируют значительно более высокие уровни S-аденозилметионина, чем нормальные лимфоциты. В лимфоцитах печени снижение уровня метионина после курсового введения экстракта куколок сопровождалось значимым приростом цистеина, поставляющего сульфгидрильные группы в метаболизм и участвующего в синтезе глутатиона и одновременно являющегося предшественником таурина. Об активации метаболического пути утилизирующего гомоцистеин свидетельствует увеличение количества цистатионина в лимфоцитах (см. табл. 6). Следует заметить, что изменение уровней всех этих показателей происходит достаточно выражено и синхронно (в 7–10 раз) по сравнению с контрольными значениями, что подтверждается имеющими место соотношениями метаболитов [7].

В то же время, в лимфоцитах, выделенных из ткани селезенки, не обнаружено достоверных изменений уровня метионина (табл. 7).

Однако, поскольку в лимфоцитах селезенки зарегистрировано снижение количества цистатионина по сравнению с контрольными значениями и снижено соотношение цистатионин/цистеин, это позволяет предположить накопление гомоцистеина. Вместе с тем, в лимфоцитах селезенки, вероятно, имеет место тенденция к накоплению таурина, что подтверждает и снижение соотношения цистеин/таурин (см. табл. 7).

Таблица 7

**Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс,  
выделенных из ткани селезенки (мкмоль/млн клеток)**

Аминокислоты	Контроль	Опыт
Метионин	0,16±0,04	0,23±0,03
Цистатионин	0,18±0,04	0,06±0,01*
Цистеин	0,76±0,19	0,81±0,16
Таурин	2,66±0,42	4,61±0,53
Метионин/цистеин	0,21±0,023	0,28±0,034
Цистатионин/цистеин	0,24±0,026	0,07±0,009*
Цистеин/таурин	0,29±0,040	0,18±0,022*

Некоторые изменения количества и соотношения серосодержащих аминокислот выявлены в лимфоцитах, выделенных из ткани тимуса (табл. 8). Несмотря на отсутствие достоверных изменений абсолютных количеств определяемых соединений, анализ соотношений позволил предположить повышение скорости наработки или поступления в клетки тиолсодержащих соединений со свободной сульфгидрильной группой (цистеин). Показано, что переносчик цистеин/глутамат не активен в покоящихся Т-лимфоцитах, но быстро индуцируется при активации Т-клеток, активно захватывая экзогенный цистеин. Глутатион и цистеин являются важными регуляторами Т-клеточной пролиферации, регуляция которой включает действие ИЛ-2.

Таблица 8

**Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс,  
выделенных из ткани тимуса (мкмоль/млн клеток)**

Аминокислоты	Контроль	Опыт
Метионин	0,45±0,12	0,34±0,12
Цистатионин	0,09±0,03	0,19±0,06
Цистеин	0,93±0,41	3,81±1,85
Таурин	5,94±2,20	5,47±1,48
Метионин/цистеин	0,48±0,049	0,09±0,011*
Цистатионин/цистеин	0,10±0,012	0,050±0,006*
Цистеин/таурин	0,16±0,014	0,70±0,077*

Напротив, истощение в лимфоцитах запасов глутатиона характерно для ранних стадий апоптоза. В этих ситуациях отток глутатиона из лимфоцитов осуществляется через специфический глутатионовый переносчик. Активация цистеиновой протеазой (каспаза-8) рецептора Fas (CD95/APO-1) в В-лимфоцитах также происходит одновременно с истощением запасов глутатиона. Снижение уровня глутатиона в иммунокомпетентных клетках наблюдается при раке, вирусных инфекциях, иммунодефицитах. Наряду с глутатионом другие тиолы также способны модулировать функцию Т-лимфоцитов, блокируя

экспрессию поверхностных маркеров, секрецию ИЛ-2 и ИЛ-6. Известно, что внутриклеточный уровень глутатиона в антиген-презентирующих клетках, таких, как макрофаги, влияет на продукцию цитокинов – тормозит Th1-ассоциированную продукцию цитокинов и благоприятствует их продукции Th2-лимфоцитами.

Выявленные различия между лимфоцитами печени, селезенки и тимуса в содержании некоторых низкомолекулярных тиолов могут быть обусловлены тем, что в популяции лимфоцитов печени имеется более высокая доля функциональных цитотоксических клеток, способных гораздо активнее, чем лимфоциты селезенки, атаковать аллогенные клетки-мишени. Печень также рассматривают как место миграции и гибели по механизму апоптоза активированных антигеном лимфоцитов. Во всяком случае, печень, прямо или косвенно, но участвует в общем ответе организма «хозяина» на антигенное воздействие. Функция селезенки является основной в «очистке» крови от бактериальных и вирусных частиц, которые сорбируются селезенкой намного эффективнее по сравнению с другими лимфоидными органами. Иммунная функция селезенки обусловлена лимфоидными клетками, заселяющими орган еще до рождения. Первичные В-клеточные фолликулы образуются к 7-му дню после рождения, что совпадает с появлением фолликулярных дендритных клеток. Окончательная миграция Т- и В-клеток в селезенку происходит под контролем цитокинов и хемокинов. Фактор некроза опухоли обеспечивает разделение лимфоидных фолликулов селезенки на Т- и В-зоны. Известно, что в селезенке наблюдается наибольшая функциональная активность лимфоидных клеток, так как хелперно-индукторная популяция CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов преобладает над CD8<sup>+</sup> супрессорно-киллерной. Селезенка является и депо NK-клеток. Стромальные фибробласты селезенки регулируют размножение и дифференцировку NK-клеток в физиологических условиях под действием ИЛ-15. Процессам перераспределения иммунокомпетентных клеток, механизмам их миграции принадлежит важная роль в реализации функций иммунной системы, включая функцию надзора и межсистемные взаимодействия, так как передача сигнала, скажем, от нейроэндокринной к иммунной системе и обратно не может не зависеть от полноценности дрейфа иммуноцитов.

Зрелые Т-лимфоциты отличаются от тимоцитов резистентностью к кортизону и способностью отвечать пролиферацией на Т-клеточные митогены: фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (КонА). Зрелый Т-лимфоцит поступает из тимуса в кровь и включается в рециркуляцию с прохождением через периферические лимфоидные органы до момента встречи с антигеном. Все выше сказанное делает очевидным отличие лимфоцитов тимуса от лимфоцитов селезенки и, в еще большей степени, от лимфоцитов, локализованных в печени [5–7].

Таким образом, курсовое введение экстракта куколок дубового шелкопряда растущим животным изменяет пул низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в лимфоцитах. Изменения содержания метионина и его метаболитов в клетках иммунной системы имеют органоспецифические особенности, что подтверждает важное значение микроокружения (homing-эффекта) в модуляции функций иммунокомпетентных клеток. Влияние экстракта куколок китайского шелкопряда на уровень метионина и его метаболитов в лимфоцитах может быть одним из механизмов иммуномодулирующего и антиоксидантного действия экстракта *in vivo*.

*Четвертый этап работы – лимфоциты печени и пул свободных аминокислот.* Известно, что гепатоциты составляют только около 2/3 общей клеточной популяции печени. Оставшаяся популяция не паренхимных клеток включает в себя синусоидальные эндотелиальные клетки, купферовские клетки, звездчатые клетки (клетки Ито), внутрипеченочные лимфоциты и клетки билиарной системы. Лимфоциты обнаруживаются как в паренхиме, так и в портальных трактах. В среднем печень человека содержит примерно  $10^{10}$  лимфоцитов, которые включают в себя ряд субпопуляций клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Специфические Т-клетки включают в себя  $CD8^+$  и  $CD4^+$  клетки. Обе популяции взаимодействуют с антигенами в контексте МНС I и II класс, соответственно. Количество  $CD8^+$  обычно превышает содержание  $CD4^+$  в печени. Количество эффекторных клеток памяти в печени выше, чем в крови. Неспецифические Т-клетки представлены различными типами клеток, которые можно разделить на две основные популяции: экспрессирующие НК-клеточные маркеры (НКТ-клетки) и те, которые на это не способны. Классические и неклассические НКТ-клетки наиболее часто встречаются в печени по сравнению с другими органами и могут составлять до 30% внутрипеченочной популяции лимфоцитов. Их миграция и/или экспансия в печень контролируется НК-клетками, которые присутствуют с необычно высокой частотой среди резидентных лимфоцитов печени. НК-клетки, представленные в лимфоидной популяции, обладают сильной цитолитической активностью в отношении вирусинфицированных или опухолевых клеток.

Печень также содержит несколько типов резидентных антиген-представляющих клеток (АПК), захватывающих антигены, которые или проходят через печень, или высвобождаются в форме ассоциированных с клеткой антигенов. Резидентные АПК включают купферовские клетки, которые являются частью ретикулоэндотелиальной системы. Образуемые купферовскими клетками цитокины играют ключевую роль в модуляции дифференциации и пролиферации других клеток. В ответ на физиологические концентрации липополисахаридов купферовские клетки продуцируют ФНО- $\alpha$ , ИЛ-10, простаноиды, оксид азота и продукты свободно-радикального окисления, которые подавляют активацию Т-клеток. Образуемые купферовскими клетками ИЛ-12 и ИЛ-18 регулируют дифференциацию НК-клеток и способствуют локальной экспрессии цитотоксических субпопуляций НК-клеток, синтезирующих большие количества антивирусного ИФН- $\gamma$ . Другие образуемые купферовскими клетками цитокины, такие как ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и лейкотриены, способствуют инфильтрации и проявлению антимикробной активности нейтрофилов в печени [5–7].

В лимфоцитах, выделенных из ткани печени животных, получавших водный экстракт куколок, регистрируется снижение общего пула протеиногенных аминокислот (в среднем на 40%) относительно контрольного уровня (табл. 9).

Это обусловлено примерно в равной степени снижением концентраций как заменимых, так и незаменимых аминокислот, поскольку соотношение заменимые/незаменимые аминокислоты существенно не изменяется. Между тем, среди пула незаменимых аминокислот наблюдаются достаточно выраженные изменения. Так, соотношение между аминокислотами с разветвленной углеродной цепью (лейцин, изолейцин, валин – АРУЦ) и ароматическими аминокислотами (тирозин, фенилаланин, триптофан – ААК) достоверно уменьшается.

Таблица 9

**Структура пула свободных аминокислот в лимфоцитах печени после курсового введения крысятам экстракта куколок китайского шелкопряда**

Показатели	Контроль	Экстракт
Сумма протеиногенных аминокислот (мкмоль/10 <sup>6</sup> )	206,4±25,6	125,1±16,3*
Заменимые аминокислоты (ЗА) (мкмоль/10 <sup>6</sup> )	110,5±13,4	71,4±7,99*
Незаменимые аминокислоты (НА) (мкмоль/10 <sup>6</sup> )	95,9±13,9	53,7±6,5*
ЗА/НА	1,15±0,15	1,33±0,18
АРУЦ/ААК	2,65±0,36	1,43±0,20*
Сумма производных аминокислот (мкмоль/10 <sup>6</sup> )	16,2±1,96	37,0±4,44*
Соотношение производные/протеиногенные аминокислот	12,7±1,14	3,4±0,29*
Сумма серосодержащих аминокислот (мкмоль/10 <sup>6</sup> )	6,64±0,84	8,8±1,06
% от суммы протеиногенных аминокислот	3,2%	7,0%
АРУЦ	40,7±5,29	12,0±1,72*
% от суммы протеиногенных аминокислот	19,7%	9,6%
% от суммы незаменимых аминокислот	42,4%	22,3%

Следует отметить, что общее количество АРУЦ в лимфоцитах печени животных, получавших экстракт куколок, уменьшается почти вдвое, как в пересчете на абсолютное содержание, так и относительно общего количества протеиногенных аминокислот, а также относительно содержания незаменимых аминокислот в лимфоцитах печени. Одновременно в лимфоцитах печени после курсового введения водного экстракта куколок увеличивается количество непротеиногенных аминокислот и азот-содержащих продуктов распада аминокислот (см. табл. 10). Содержание этих соединений увеличивается более чем в 2 раза, а соотношение с протеиногенными, напротив, падает более чем в 3 раза.

Анализ изменений индивидуальных концентраций свободных аминокислот в лимфоцитах печени показывает, что достоверные изменения имеют место в большей степени среди пула незаменимых аминокислот. Так, более чем в 2 раза снижены уровни треонина, валина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, метионина и цистеина. Из заменимых аминокислот следует отметить уменьшение содержания аспарагина, тирозина, аланина и пролина (табл. 10).

Среди непротеиногенных аминокислот и азот-содержащих продуктов распада аминокислот в лимфоцитах печени животных, получавших водный экстракт куколок особо следует выделить увеличение концентраций орнитина, цистатионина, цитруллина и таурина. Функции таурина достаточно хорошо известны, в том числе и в иммуно-

компетентных клетках. Увеличение его наработки из метионина, о чем свидетельствуют и колебания концентраций цистатионина и цистеина, являются вполне логичным с точки зрения активизации функций лимфоцитов. Повышение концентрации орнитина, вероятно, обусловлено активным метаболизмом аргинина и синтезом полиаминов, тогда как высокие уровни цитруллина, возможно, будут способствовать цитруллинированию белков [7–9].

Транспортные белки, переносящие цитруллин, описаны, в макрофагах и в Т-лимфоцитах. Поскольку цитруллин легко превращается в аргинин, он может быть использован как предшественник оксида азота. Следовательно, многие типы клеток, способные метаболизировать аргинин с образованием оксида азота, захватывают циркулирующий цитруллин – это объясняет, почему цитруллин индуцирует многие эффекты оксида азота. В активированных макрофагах цитруллин рециркулирует, давая до 20% образуемого в клетках оксида азота. Когда потребность в NO возрастает, цитруллин может быть синтезирован *in situ* из глутамата [7–9].

Таблица 10

**Содержание протеиногенных аминокислот в лимфоцитах печени (мкмоль/10<sup>6</sup>) после курсового введения экстракта куколок китайского дубового шелкопряда**

Аминокислоты	Контроль	Экстракт
Аспарат	10,37±2,04	10,82±3,51
Глутамат	17,20±3,03	12,05±0,72
Аспарагин	4,86±0,64	1,97±0,41*
Серин	19,73±3,64	15,96±6,55
Глутамин	1,01±0,34	0,74±0,13
Гистидин	4,09±0,63	2,47±0,87
Глицин	7,79±1,48	5,23±1,64
Треонин	14,39±1,89	4,02±1,28*
Аргинин	1,18±0,13	1,46±0,27
Аланин	27,90±5,25	12,15±3,06*
Тирозин	6,29±0,68	3,31±0,99*
Валин	12,37±2,15	3,32±0,86*
Метионин	4,44±0,53	0,51±0,08*
Цистеин	0,49±0,04	4,27±0,79*
Триптофан	0,68±0,09	0,40±0,13
Фенилаланин	8,41±1,28	4,68±1,05*
Изолейцин	9,30±1,03	4,90±1,38*
Лейцин	19,04±2,82	3,75±0,77*
Лизин	20,55±5,57	24,50±3,70
Пролин	16,35±2,19	8,55±1,29*

Достаточно активно в лимфоцитах печени под влиянием водного экстракта куколок происходит деградация пролина, лизина и глутамата, что проявляется увеличением соответствующих катаболитов – гидроксипролина, аминокадипиновой и аминокислотной (см. табл. 11).

Следует заметить, что в отличие от концентраций свободных аминокислот уровень их метаболитов, в среднем, на порядок меньше.

Таким образом, курсовое введение активно растущим животным водного экстракта куколок дубового шелкопряда стимулирует использование свободных аминокислот в лимфоцитах печени, что проявляется снижением их общего количества и изменениями структуры аминокислотного фонда.

Учитывая показанное ранее иммуностимулирующее и антиоксидантное действие гидрофильных компонентов содержимого куколок дубового шелкопряда, полученные данные могут быть использованы в дальнейшем как маркер увеличения функциональной активности клеток иммунной системы.

Таблица 11

**Непротеиногенные аминокислоты и производные свободных аминокислот в лимфоцитах печени после курсового введения крысятам экстракта куколок китайского шелкопряда**

Производные аминокислот	Контроль	Опыт
$\alpha$ -аминокадипиновая кислота	0,17±0,05	0,97±0,29*
Фосфоэтанолламин	0,23±0,04	0,76±0,34
1-метилгистидин	0,21±0,04	0,17±0,04
Цитруллин	0,32±0,02	0,59±0,12*
$\beta$ -аланин	0,36±0,07	0,42±0,06
Таурин	1,64±0,11	3,20±0,53*
$\beta$ -аминомасляная кислота	0,02±0,003	0,07±0,01
$\gamma$ -аминомасляная кислота	0,07±0,004	0,39±0,06*
$\alpha$ -аминомасляная кислота	0,08±0,02	0,16±0,03*
Этанолламин	2,37±0,54	2,57±0,47
Цистатионин	0,07±0,009	0,82±0,19*
Гидроксипролин	0,07±0,01	0,65±0,09*
Орнитин	10,62±1,70	26,26±4,85*

**Заключение.** Приведенные материалы показывают, что реакции изолированных клеток на действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда зависят от типа клеток и дозы экстракта: малые дозы стимулируют антиоксидантный эффект нейтрофилов, а относительно высокие дозы активируют фагоцитоз макрофагами и модулируют метаболизм и функции тканевых лимфоцитов.

*Работа поддержана грантом Бр ФФИ № Б09–154 от 15 апреля 2009 г.*

**Л и т е р а т у р а**

1. Новиков, Д.К. Медицинская иммунология / Д.К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – 301 с.
2. Горецкая, М.В. Влияние экстракта куколок шелкопряда на функциональную активность нейтрофилов / М.В. Горецкая, В.М. Шейбак, А.А. Чиркин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 2. – С. 25–30.
3. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) / А.А. Чиркин [и др.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 248–265.
4. Трокоз, В.А. Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).
5. Castellani, P. The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations / P. Castellani, G. Angelini, L. Delfino, A. Matucci // Eur. J. Immunol. – 2008. – Vol. 38, № 9. – P. 2419–2425.
6. Lefkovits, I. Quantitative proteomics of lymphocytes / I. Lefkovits // Comp Funct Genomics. – 2003. – Vol. 4, № 5. – P. 531–536.
7. Racanelli, V. The liver as an immunological organ / V. Racanelli, B. Rehermann // Hepatology. – 2006. – Vol. 43. – P. 54–62.
8. Sheth, K. The liver as an immune organ / K. Sheth, P. Bankey // Curr. Opin Crit. Care. – 2001. – Vol. 7. – P. 99–104.
9. Wick, M. The hepatic immune system / M. Wick, F. Leithauser, J. Reimann // Crit. Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 22. – P. 47–103.

*Поступило 3.02.2009*