УДК 595.78:577.3

Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (Antheraea pernyi G.-M.)

А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.М. Шейбак, В.Ю. Смирнов, Е.М. Дорошенко, Л.И. Надольник, Д.И. Паршонок, С.И. Денисова

Показано, что водный экстракт гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда обладает выраженным антиоксидантным действием, ингибирует пероксидазную и галогенирующую активность миелопероксидазы нейтрофилов, перехватывает гипохлорит и пероксинитрит, но не ингибирует образование супероксида НАДФН-оксидазой. Можно предположить, что водный экстракт жидкого содержимого куколок китайского дубового шелкопряда или его определенные компоненты могут быть эффективны в терапии заболеваний, связанных с оксидативным или нитрозативным стрессом и с участием миелопероксидазы.

Мощными источниками оксидантов в организме являются фагоцитирующие клетки крови, в первую очередь, сегментоядерные нейтрофилы. Основная функция нейтрофилов – уничтожение патогенных бактерий и грибов [1, 2]. Активированные нейтрофилы генерируют ферментативным образом продукты с высокой реакционной способностью с помощью НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО) [3, 4]. Данные редокс-ферменты активируются при стимуляции нейтрофилов бактериальными пептидами, белками острой фазы, некоторыми провоспалительными цитокинами, адгезионными молекулами, индукторами фагоцитоза. НАДФН-оксидаза и МПО последовательно формируют активированные формы кислорода и галогенов (АФКГ) ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $^{\cdot}OH$, HOCl, HOBr), способные окислять многие биологически важные молекулы [1–5].

Показано, что при вовлечении нейтрофилов в патофизиологические реакции в организме НАДФН-оксидаза, МПО и другие редокс-ферменты нейтрофилов принимают различное участие [2, 5]. НАДФН-оксидаза представляет собой мембраносвязанный комплекс, генерирующий $O_2^{\cdot -}$ у наружной поверхности клеток или внутри фаголизосом [4]. МПО, депонированная в покоящихся клетках внутри азурофильных гранул, при активации нейтрофилов может высвобождаться внутрь фаголизосом и катализировать там окислительно-восстановительные реакции, а может секретироваться во внеклеточное пространство и вовлекаться в различные процессы даже без дальнейшего участия нейтрофилов [3, 6]. МПО проявляет высокую окислительную активность, что необходимо для внутриклеточного и внеклеточного уничтожения патогенных микроорганизмов при острой воспалительной реакции. В то же время доказано, что секретированная во внеклеточное пространство МПО является причиной модификации биополимеров и липидов в плазме крови, эндотелии и других тканях организма и может промотировать развитие

хронического воспаления, связанного с атеросклерозом, бронхиальной астмой, аллергическими дерматитами, циститным фиброзом [1, 7, 8]. Повышение содержания МПО в плазме является прогностически неблагоприятным признаком при некоторых заболеваниях, например, уровень МПО в плазме коррелирует с риском инфаркта миокарда [9]. Следует отметить, что хотя в настоящее время существует ряд высокоэффективных лекарственных препаратов с антиоксидантным действием, тем не менее по-прежнему остается актуальным поиск веществ с избирательным действием на отдельные редоксферменты и оксиданты.

В природе имеется объект – куколка, содержащая биологическую жидкость, между стадиями двух эукариотических организмов – гусеницы и бабочки. В состоянии диапаузы куколка находится 7–8 месяцев. В этом периоде главным является не допустить разрушения низкомолекулярных биорегуляторов и биополимеров жидкости активными формами кислорода. Поэтому можно предположить, что именно в этом объекте эволюционно отобрана оптимальная антиоксидантная система, позволяющая пройти этап диапаузы без модификации и потерь молекул, необходимых для формирования бабочки. Поэтому целью исследования явился анализ содержимого куколок китайского дубового шелкопряда и его применение для протекции нарушений обмена веществ при моделировании окислительного стресса in vivo.

Анализ гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда

На первом этапе исследования содержимое куколок помещали в 10 мл 0,9% раствора NaCl (для предотвращения окисления) и гомогенизировали путем размешивания на магнитной мешалке 10 мин. Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 15000 об/мин. В центрифужных пробирках получали 3 слоя: жироподобное вещество в верхней части пробирки, надосадочную жидкость и осадок на дне пробирки. После удаления жирового слоя и снятия надосадочной жидкости к осадку добавляли еще раз 10 мл 0,9% раствора NaCl, проводили гомогенизацию и центрифугирование. 2,5 мл надосадочной жидкости пропускали через хроматографическую колонку, заполненную Sephadex G25 fine. Высота колонки 25 см, диаметр 2,5 см, объем 125 см^3. Использовали для элюции 0,01 М $NaHCO_3$. Анализ элюатов (пробирки 1–53) проводили путем спектрофотометрии при 260 и 280 нм. Содержание вещества оценивали по формуле A280×1,55 – A260×0,76 (мг/мл).

Результаты хроматографии и ее графическая интерпретация представлены на рис. 1.

Из анализа рис. 1 следует, что в гомогенате гемолимфы находятся 3 группы белоксодержащих веществ. Учитывая, что основная масса веществ, имеющих поглощение при 260 и 280 нм, находилась в 3-м пике (пробирки 34–52), был проведен спектрофотометрический анализ при разведении водных экстрактов куколок китайского дубового шелкопряда (ВЭКШ). ВЭКШ получали по методу В.А. Трокоза и соавторов [12].

Были определены спектры поглощения ВЭКШ в диапазонах 190–350 нм и 350–700 нм (рис. 2 и 3). Проанализированы разведения ВЭКШ с содержанием белка 30 мг/мл, 3 мг/мл и 300 мкг/мл. Выявлены две широкие полосы с максимумами в областях 224–234 нм и 290–294 нм. Было высказано предположение, что полосу 290–294 нм дает, главным образом, тирозин (у триптофана она должна быть шире).

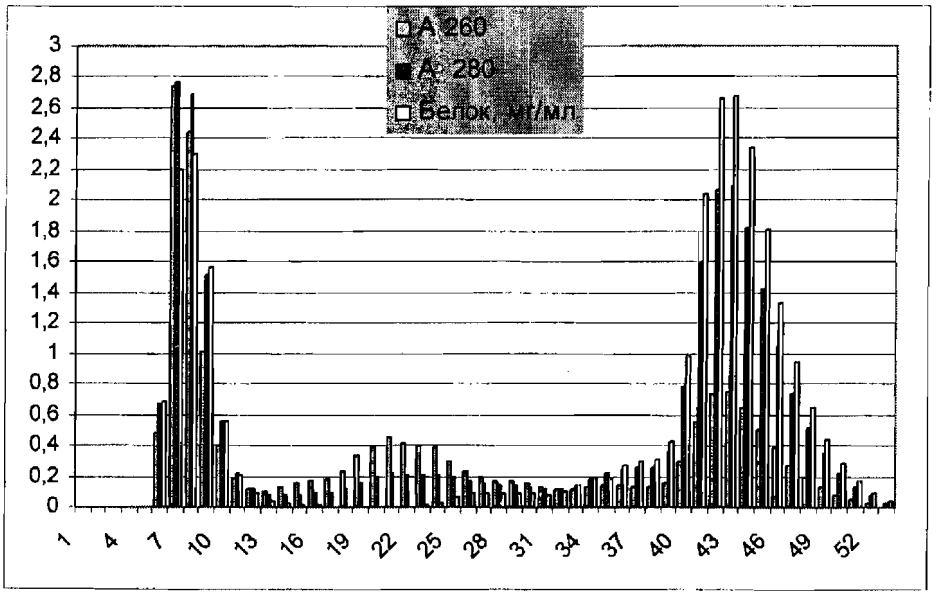


Рис. 1. **Хроматография гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда на сефадексе.**

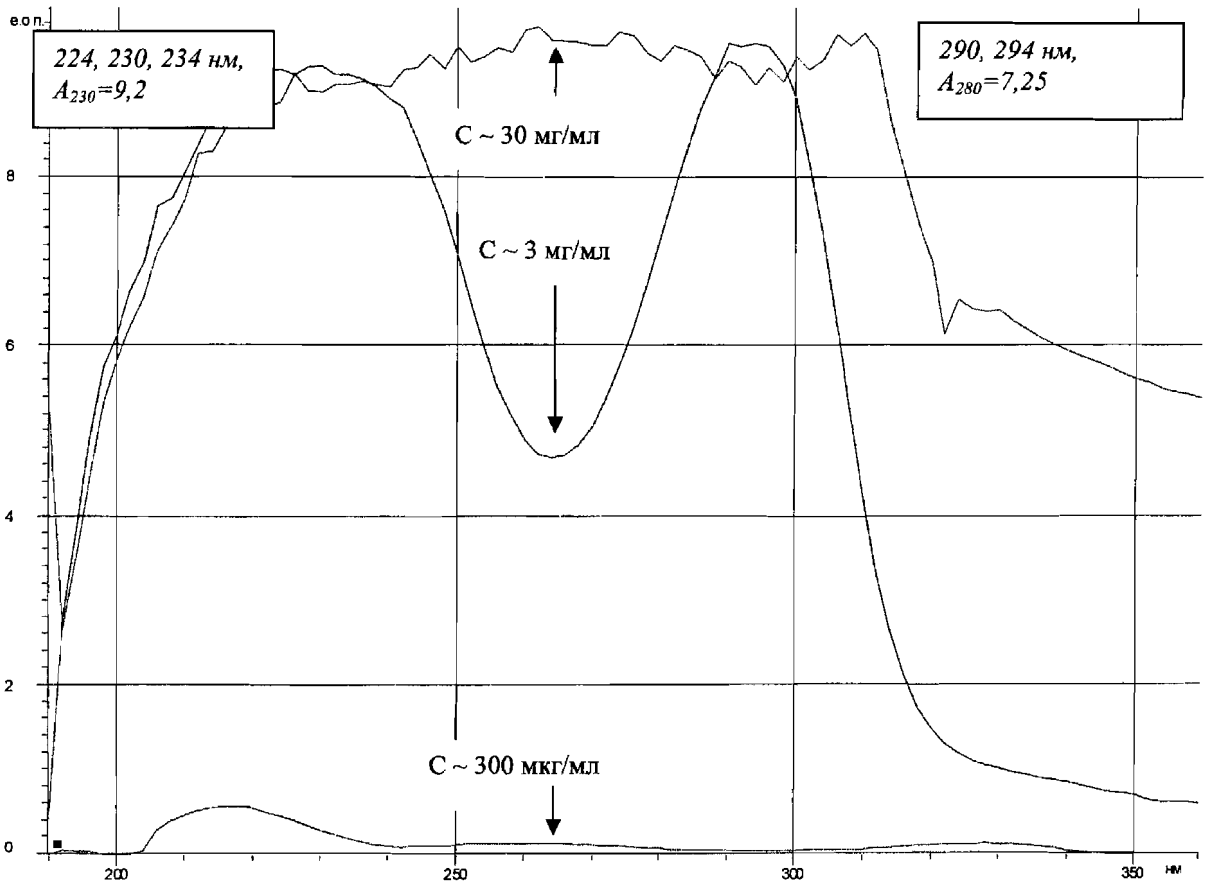


Рис. 2. **Оптическая плотность растворов ВЭКШ в диапазоне 190–350 нм.**

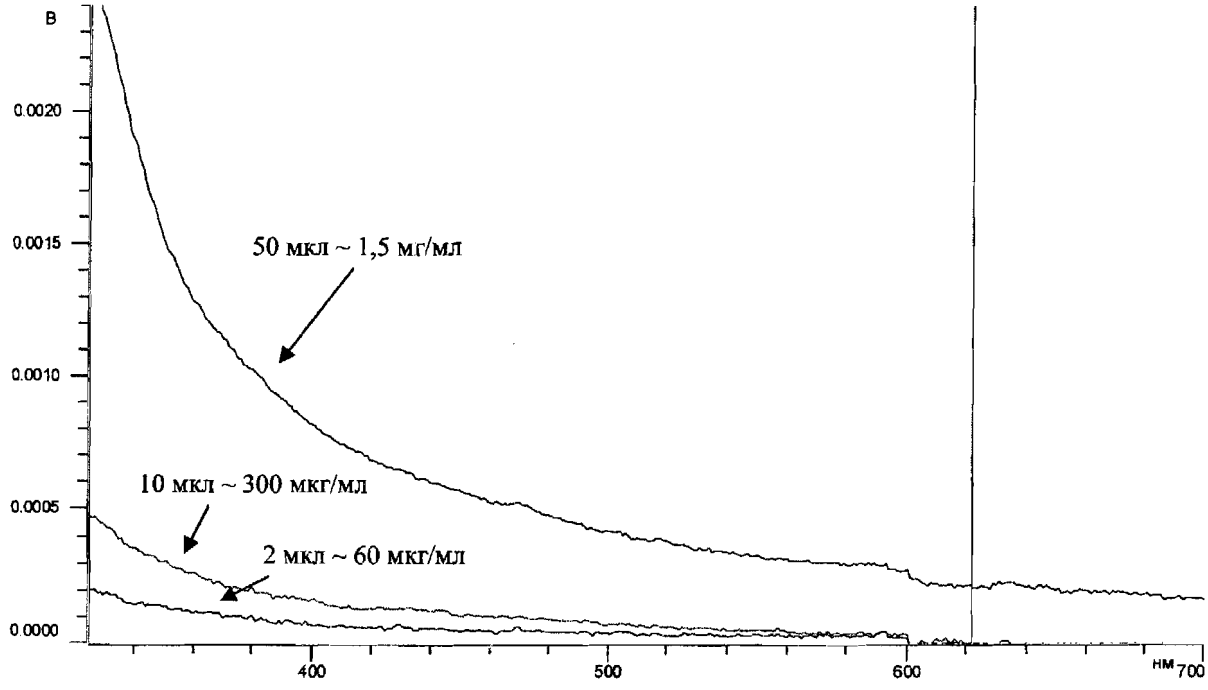


Рис. 2'. **Оптическая плотность растворов в ближней УФ и видимой областях (350–700 нм).**

Растворы: на 1 мл среды Эрла добавлен ВЭКШ 50 мкл, 10 мкл, 2 мкл. Концентрация ВЭКШ изменяется от образца к образцу в 5 раз, оптическая плотность приблизительно тоже. Видно, что концентрация открываемых веществ подчиняется закону Бугера–Ламберта–Бера. Общий анализ полученных результатов позволяет предположить, что в куколках содержится большое количество триптофана и тирозина, которые поглощают ультрафиолетовый свет в диапазоне 240–290 нм.

Разделение методом тонкослойной хроматографии на силикагеле выявило наличие нескольких флуоресцирующих компонентов гемолимфы (система п-бутанол:уксусная кислота:вода = 4:1:5). Количественная реакция указывает на наличие дигидроксихинонов.

Концентрация свободных низкомолекулярных продуктов, содержащих сульфгидрильные группы, низка ~ 10^{-6} М. Некоторые показатели антиоксидантной системы гемолимфы куколок шелкопряда представлены в табл. 1.

Таблица 1

Прооксидантно-антиоксидантные характеристики гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда

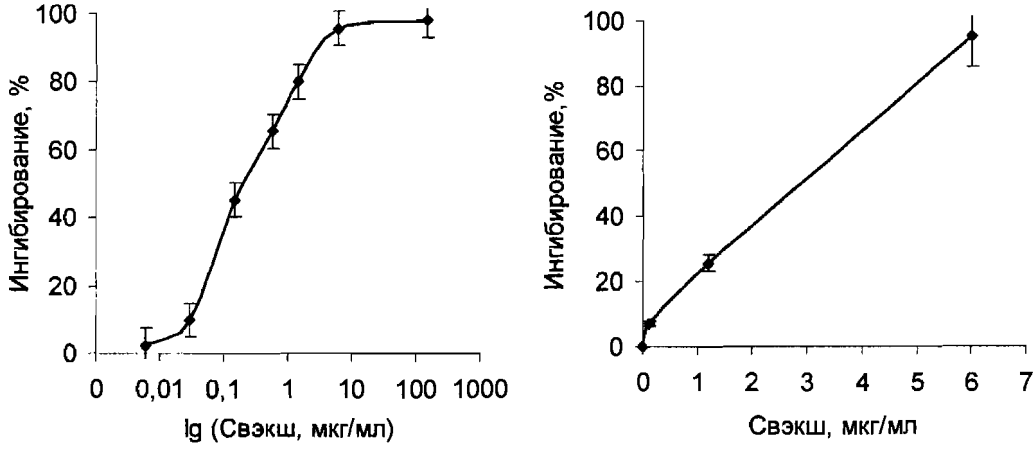
Показатель	Количество
Концентрация белка, мг/мл	55±4,0
Низкомолекулярные свободные тиолы, моль	~10^{-6}
Продукты пероксидного окисления липидов (ТБК-позитивные вещества), нмоль/мг белка	0,35±0,60
Глутатионпероксидаза, нмоль GSH/мин×мг белка	42±9,0

Вышеизложенное побудило провести анализ количественного содержания свободных аминокислот методом ВЭЖХ.

В дальнейших исследованиях был применен хемилюминесцентный метод определения пероксидазной активности. По скорости окисления люминола пероксидом водорода в присутствии пероксидазы оценивают активность фермента. При фиксированных концентрациях люминола и H_2O_2 скорость реакции является характеристикой активности пероксидазы. Скорость реакции определяем по интенсивности возникающего при этом свечения (ЛЗХЛ).

Оказалось, что ВЭКШ вызывает снижение интенсивности ЛЗХЛ в системах данного типа, что свидетельствует о его ингибирующем влиянии на реакцию пероксидазного окисления люминола (рис. 3, А – миелопероксидаза нейтрофилов, Б – пероксидаза хрена).

Ингибирующее влияние ВЭКШ на интенсивность ЛЗХЛ в системе (А) позволяет предположить, что ВЭКШ может служить ингибитором миелопероксидазы в организме и препятствовать окислению (или галогенированию) субстратов с участием МПО.



А Б

Рис. 3. **Влияние ВЭКШ в различных концентрациях на интенсивность ЛЗХЛ в системе, содержащей:**

А) <u>миелопероксидазу</u> разрушенных нейтрофилов (7 млн/мл, 100 мкл/1 мл в фосфатном буфере, pH=7,5), H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л), люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л);

Б) <u>пероксидазу хрена</u> (0,02 нг/мл, 10 мкл/1мл среды Эрла, pH=7,3), H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л), люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

Эффект ингибирования проявляется при концентрациях ВЭКШ выше 0,1 мкг/мл (разбавление исходного раствора в 300000 раз), насыщение достигается при концентрации порядка 6–10 мкг/мл (разбавление исходного раствора в 3000 раз) как в одной, так и в другой системе.

Существенный интерес представляют кислородзависимые механизмы бактерицидности нейтрофилов. Миелопероксидаза (МПО) – бактерицидный фермент нейтрофилов, депонированный в азурофильных гранулах. При активации нейтрофилов в ходе воспаления в этих клетках осуществляется сборка и активация НАДФН-оксидазного комплекса, генерирующего супероксидные радикалы ($O_2^{\cdot -}$). При дисмутации из $O_2^{\cdot -}$ образуется пероксид водорода H_2O_2, который далее может использоваться миелопероксидазой для окисления ряда субстратов.

Активность НАДФН-оксидазы в нейтрофилах, так же как и дегрануляция азурофильных гранул, приводящая к введению МПО в протекающие в клетке реакции, строго контролируются. При различных стимулирующих воздействиях нейтрофилы будут активироваться по-разному и будут генерировать активные кислородные формы (АФК) во внеклеточной среде (при адгезии на субстрат), внутри фаголизосом (при фагоцитозе, действии латекса), будут активироваться кратковременно (при действии хемоаттрактантов, например fMLP) или продолжительно (например при адгезии, фагоцитозе). МПО и НАДФН-оксидаза при этом также будут давать различный вклад в процесс.

Способность нейтрофилов генерировать супероксидные радикалы НАДФН-оксидазной системой можно оценивать методом люцигенин-опосредованной ХЛ. Исследуя люминол-опосредованную ХЛ нейтрофилов, оценивают суммарную продукцию клетками АФК, активность НАДФН-оксидазы, МПО.

Оказалось, что ВЭКШ приводит к ингибированию люминольной ХЛ нейтрофилов при стимуляции клеток в ходе адгезии, при фагоцитозе латекса, при действии хемоаттрактанта fMLP (рис. 4).

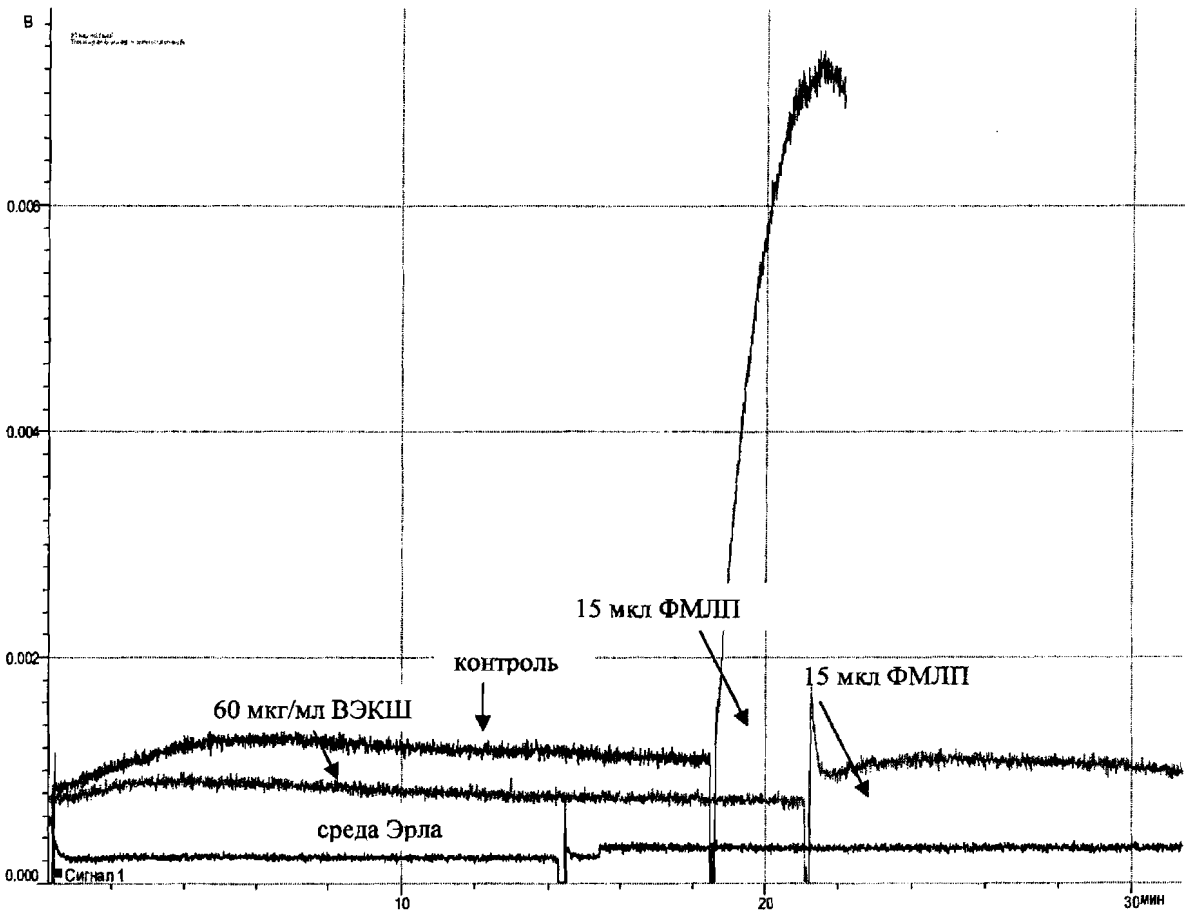


Рис. 4. **Кинетические зависимости интенсивности люминольной ХЛ нейтрофилов при их адгезии и при добавлении fMLP–ФМЛП (через 20 мин после начала адгезии клеток) в отсутствии ВЭКШ (верхняя кривая) и в присутствии 60 мкг/мл ВЭКШ (средняя кривая).**

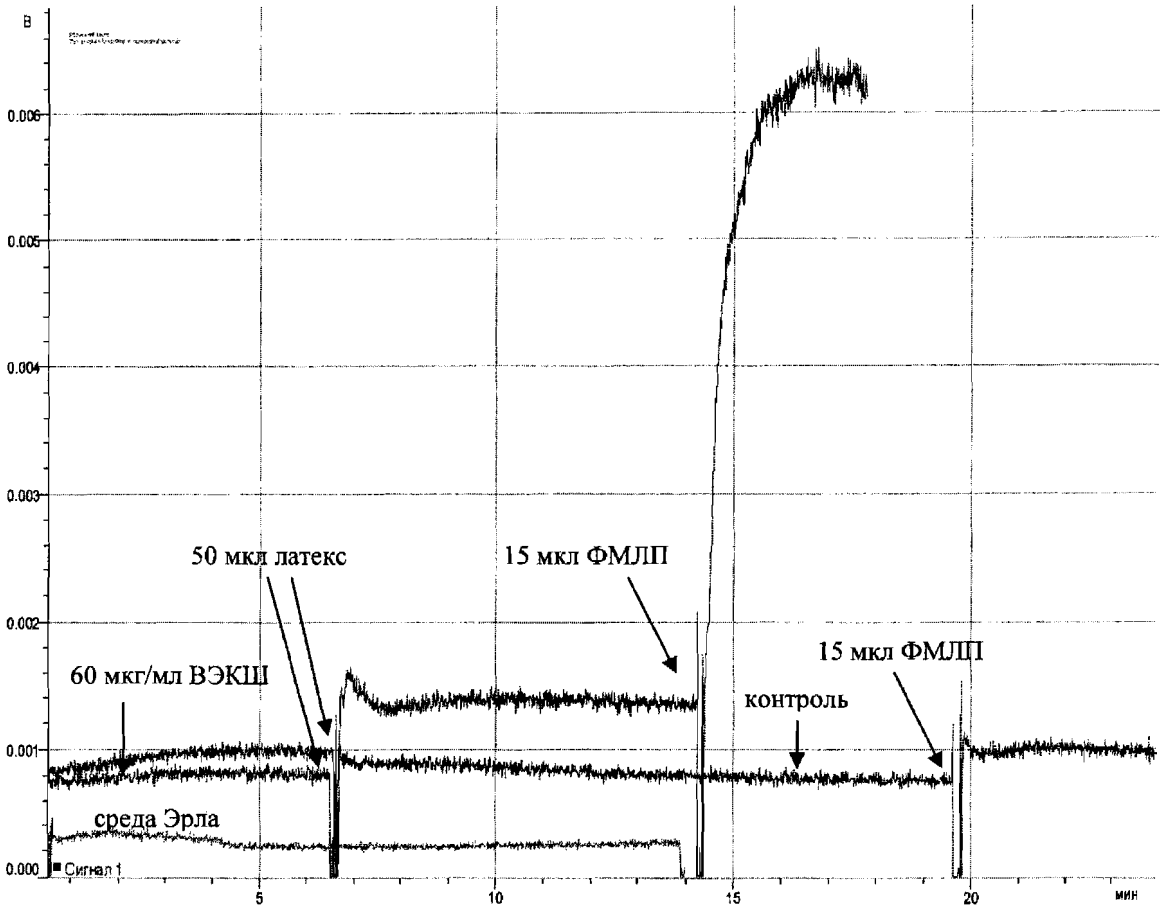


Рис. 5. **Кинетические зависимости интенсивности люминольной ХЛ нейтрофилов при их адгезии и при добавлении латекса (стимулятор фагоцитоза, через 6,5 мин), fMLP–ФМЛП (через 8 мин после латекса) в отсутствии ВЭКШ (верхняя кривая) и в присутствии 60 мкг/мл ВЭКШ (средняя кривая).**

Оказалось, что в наибольшей степени ВЭКШ (12–60 мкг/мл) ингибировал люминольную ХЛ нейтрофилов (то есть, суммарную продукцию АФК, активность НАДФН-оксидазы и МПО) на fMLP и в меньшей степени – на латекс (фагоцитоз) и при адгезии. ВЭКШ слабо ингибировал люцигениновую ХЛ нейтрофилов (образование супероксида). Следовательно, его действие может быть направлено в большей степени не на активность НАДФН-оксидазы или супероксид, а на другие АФК и на активность МПО.

Методика определения спектров свободных и суммарных аминокислот

Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводится катионообменной хроматографией одноколоночным методом на автоанализаторе аминокислот Т-339М (Чехия) по модифицированному методу J.V. Benson, J.A. Paterson (1974) [2]. Принцип метода заключается в элюции аминокислот и родственных им соединений ступенчатым градиентом Li-цитратных буферных

растворов. После нанесения кислотного экстракта на аналитическую колонку (22,0×0,35 см), заполненную сферическим катионообменником LGAN 2B (размер частиц 8 мкм; «Lachema», Чехия), хроматографическое разделение исследуемых соединений последовательно осуществляется Li-цитратными буферами. Скорость потока растворов 14 мл/час, рабочее давление на колонке 2,5–3,5 МПа. Температура анализа дискретно повышается в середине аналитического цикла с 40 до 62°С. Количественное содержание каждого компонента спектра исследуемых соединений оценивается по реакции с 1% раствором нингидрина (скорость потока 12 мл/час) в капиллярной бане при 100°С при длине волны 520 нм после прохождения через проточную кювету однолучевого фотометра. Сигнал с выхода фотометра поступает на программно-аппаратный комплекс «Мультихром-1», где происходит регистрация, обработка, идентификация пиков и вычисление концентраций по площадям пиков.

Качественная идентификация и количественная оценка полученных значений производится программой путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот и нингидринположительных компонентов. Последняя содержит равные количества определяемых соединений по 250 нмоль/мл каждого и в качестве внутреннего стандарта в нее добавляют в той же концентрации норлейцин (концентраты стандартных смесей фирмы «Calbiochem», США). В описанной системе последовательно элюируются и определяются следующие соединения: цистеиновая кислота (CA), таурин (Tau), фосфоэтаноламин (PEA), мочевина (urea), аспарагиновая кислота (Asp), OH-пролин (H-Pro), треонин (Thr), серин (Ser), аспарагин (Asn), глутаминовая кислота (Glu), глутамин (Gln), α-аминоадипиновая кислота (α-AAA), пролин (Pro), глицин (Gly), аланин (Ala), α-аминомасляная кислота (α-ABA), цитруллин (Ctr), валин (Val), цистин (Cys), метионин (Met), цистатионин (Ctn), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), норлейцин (n-Leu), β-аланин (β-Ala), β-аминомасляная кислота (β-ABA), γ-аминомасляная кислота (GABA), этаноламин (EA), аммиак (NH_3), орнитин (Orn), лизин (Lys) и гистидин (His). Весь цикл аналитического процесса (включая регенерацию колонки 0,2 Н LiOH и ее стабилизацию стартовым 0,2 М Li-цитратным буфером pH 2,8) составляет 200 мин. Воспроизводимость метода ±1,5%, чувствительность – 10^{-9} моль. Реагенты готовятся из коммерческих комплектов для определения свободных аминокислот («Lachema») на деионизованной воде, которая перед использованием подвергается двойной дистилляции.

Данные о свободных аминокислотах куколок китайского дубового шелкопряда

Исследованиями украинских ученых доказано, что куколки китайского дубового шелкопряда являются эффективным источником многих биологически активных веществ [10]. В связи с этим был проанализирован спектр свободных аминокислот куколок китайского дубового шелкопряда с учетом кормовой базы гусениц (табл. 2).

Таблица 2

Спектр свободных аминокислот куколок китайского дубового шелкопряда (моль/л)

Аминокислота	Питание листьями дуба	Питание листьями березы	Без учета питания
Таурин	0,70±0,08	1,12±0,08[1]	0,98±0,11
Асп	3,81±0,57	5,59±0,68[1]	4,70±0,56
Тре	10,3±0,36	10,2±0,49	10,3±0,27
Сер	16,2±2,04	10,1±1,07[1]	13,1±1,71
Глу	1,03±0,10	0,76±0,06[1]	0,90±0,08
Глн	15,2±0,99	22,9±1,36[1]	19,1±1,89
Про	4,86±0,24	6,31±0,51[1]	5,59±0,41
Гли	16,1±0,75	18,2±1,55	17,1±0,91
Ала	22,7±3,27	14,0±2,06[1]	18,3±2,60
Альфа-АБА	0,034	0,016	0
Вал	8,49±0,21	7,83±0,19[1]	8,16±0,19
Мет	0,80±0,08	0,54±0,10[1]	0,67±0,08
Цитр	2,26±0,26	2,04±0,14	2,15±0,14
Иле	4,54±0,19	4,14±0,12	4,34±0,14
Лей	4,70±0,16	4,82±0,24	4,76±0,13
Тир	2,86±0,38	2,20±0,12	2,53±0,23
Фен	0,90±0,03	1,15±0,04[1]	1,04±0,07
Бета-АБА	0,56±0,04	0,46±0,01[1]	0,51±0,03
Этаноламин	0,21±0,01	0,24±0,03	0,23±0,02
Орнитин	0,05±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
Лиз	8,30±0,73	9,02±1,03	8,70±0,59
Гис	10,4±0,76	10,1±0,27	10,3±0,37

Примечание: [1] – $P<0,05$.

Итак, в жидкости куколок китайского дубового шелкопряда должен содержаться оптимальный для синтеза белков эукариотического организма спектр аминокислот. По данным табл. 2, общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколок китайского дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л, в том числе обнаружены (M±m, ммоль/л) глутамин (19,07±1,886), аланин (18,33±2,601), глицин (17,15±0,907), серин (13,13±1,711), треонин (10,28±0,272), гистидин (10,26±0,367), лизин (8,659±0,586), валин (8,162±0,193), пролин (5,586±0,409), лейцин (4,763±0,133), аспарагиновая кислота (4,700±0,561), изолейцин (4,337±0,145), тирозин (2,530±0,230), цитрулин (2,152±0,141), фенилаланин (1,043±0,070), таурин (0,976±0,112), глутаминовая кислота (0,899±0,081), метионин (0,672±0,083), бета-аланин (0,511±0,029), этаноламин (0,227±0,016), орнитин (0,044±0,001). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии не выявлены аминокислоты аспарагин, цистеин и триптофан. По сравнению со спектром свободных аминокислот растений в жидком содержимом куколок содержится больше глицина, лизина, гистидина, пролина и глутамина, а также снижено

содержание глутаминовой кислоты и фенилаланина. Аминокислотный состав куколок близок к биологически полноценным белкам молока.

Интересно, что характер кормовой базы может модифицировать аминокислотный состав куколки. Оказалось (табл. 2), что при питании гусениц березовыми листьями в куколках содержится больше таурина, аспарагиновой кислоты, глутамина, пролина и фенилаланина и меньше серина, глутаминовой кислоты, аланина, валина, метионина и бета-аланина по сравнению с куколками, сформированными из гусениц, питавшихся дубовыми листьями.

Антиоксидантное действие водного экстракта куколок китайского дубового шелкопряда

Проведено исследование влияния водного экстракта жидкого содержимого куколок китайского дубового шелкопряда (ВЭКШ) на образование оксидантов нейтрофилами. Нейтрофилы изолировали из периферической крови здоровых людей разделением в градиенте плотности фиколл-урографина. Суммарную генерацию АФКГ нейтрофилами регистрировали методом люминол-опосредованной хемилюминесценции (ХЛ). Отдельно анализировали формирование клетками $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 по интенсивности люцигенин-опосредованной ХЛ. Также определяли влияние ВЭКШ на скорость окисления люминола в бесклеточных системах, содержащих МПО или пероксидазу хрена (ПХ) и пероксид водорода.

Обнаружено, что *in vitro* ВЭКШ оказывает ингибирующее влияние на образование АФКГ в нейтрофилах, определяемое по люминол-опосредованной ХЛ, что свидетельствует о его антиоксидантном действии. Ингибирование генерации АФКГ обнаружено при стимуляции нейтрофилов хемотаксическим пептидом fMLP, индуктором фагоцитоза латексом и в процессе адгезии (рис. 6).

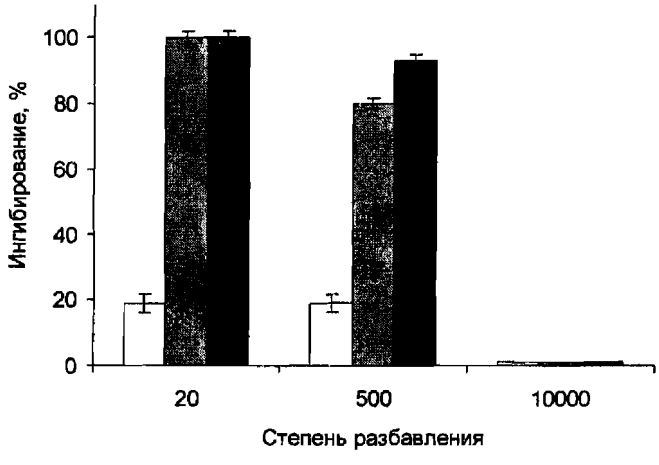


Рис. 6. **Ингибирующее действие ВЭКШ на люминол-опосредованную ХЛ стимулированных нейтрофилов. □ – клетки стимулированы в ходе адгезии к стеклу; ■ – при действии латекса; ■ – при действии fMLP. По оси абсцисс – степень разбавления экстракта ВЭКШ после его внесения в реакционную среду, характеризует количество ВЭКШ в среде. Указан 95% доверительный интервал. n=3. pH 7,3, содержание нейтрофилов – 2 млн/мл.**

Оказалось, что ВЭКШ избирательно ингибирует формирование АФКГ с участием МПО и не вызывает снижения образования $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2, обусловленных активацией НАДФН-оксидазы, определяемой по люцигенин-опосредованной ХЛ (рис. 7).

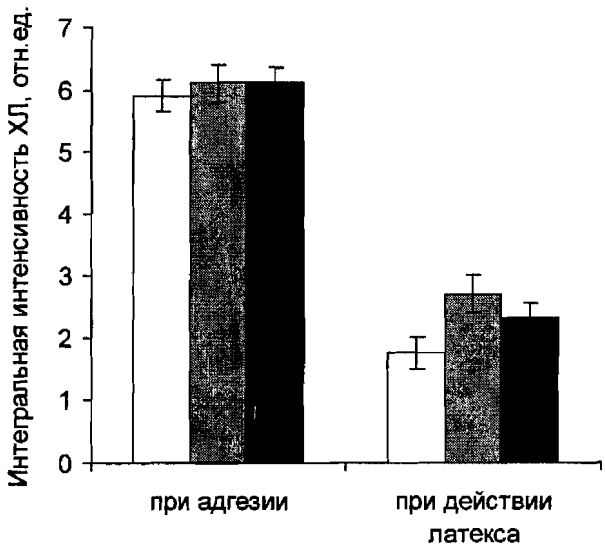


Рис. 7. **Влияние ВЭКШ на люцигенин-опосредованную ХЛ нейтрофилов, стимулированных в процессе адгезии к стеклу и при добавлении латекса. □ – клетки стимулированы в отсутствие ВЭКШ; ■ – в присутствии ВЭКШ, степень разбавления 500 раз; ■ – в присутствии ВЭКШ, степень разбавления 100 раз. Указан 95% доверительный интервал. n=3. pH 7,3, содержание нейтрофилов – 2,5 млн/мл.**

Исследование влияния ВЭКШ на окисление люминола в бесклеточных системах, содержащих МПО или ПХ, показало, что в данных системах ВЭКШ вызывает более интенсивный ингибирующий эффект, чем в суспензии клеток (рис. 8). В бесклеточных системах эффект ингибирования обнаруживался даже при разбавлении ВЭКШ в 100000 раз, тогда как ингибирование клеточных реакций не выявлялось даже при разбавлении в 10000 раз.

Мы предположили, что ВЭКШ напрямую взаимодействует с МПО, высвобождающейся из клеток в среду, но не с внутриклеточной МПО. Для того, чтобы проверить эту гипотезу, была изучена способность нейтрофилов генерировать АФКГ после предварительного инкубирования клеток с ВЭКШ в течение 40 мин при 37°С и последующей отмывки клеток. Оказалось, что способность формировать АФКГ у нейтрофилов, инкубированных без ВЭКШ, и клеток, инкубированных с ВЭКШ, а затем отмытых от несвязанного ВЭКШ, практически не различаются (рис. 9). Это свидетельствует о том, что ВЭКШ не сорбируется клетками и не приводит к снижению способности клеток генерировать АФКГ в ответ на стимуляцию. По-видимому, компоненты ВЭКШ не проникают внутрь клеток и контролируют реакции, происходящие с участием МПО, во внеклеточном пространстве.

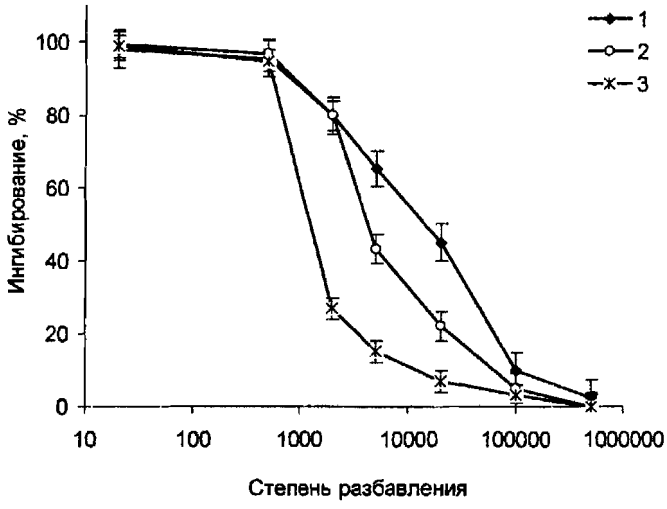


Рис. 8. **Зависимость ингибирующего действия ВЭКШ на окисление и хлорирование люминола в различных системах от количества вносимого ВЭКШ. По оси абсцисс – степень разбавления ВЭКШ после его внесения в реакционную среду, характеризует количество ВЭКШ в среде. По оси ординат – ингибирующее действие ВЭКШ в системах, содержащих: 1 – 1 мл разрушенных нейтрофилов (0,7 млн/мл)+ H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 2 – 1 мл среды Эрла + люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + HOCl ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л); 3 – 1 мл среды Эрла + ПХ (2 нг/мл) + люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Указан 95% доверительный интервал. n=3. pH 7,3.**

Реакции окисления субстратов в присутствии H_2O_2 типичны для всех видов пероксидаз, то есть, и для МПО, и для ПХ, тогда как реакции хлорирования (бромирования) субстратов и образования чрезвычайно токсичных гипогалогенитов HOCl (HOBr) характерны для МПО, но не ПХ [9]. Хемилюминесценция люминола наблюдается как при его окислении, так и при галогенировании. Поскольку ВЭКШ ингибировал ХЛ в системе, содержащей МПО (рис. 8, кривая 1), и также в системе, содержащей ПХ (рис. 8, кривая 3), мы заключили, что ВЭКШ ингибирует окисление. На рис. 8 (кривая 2) показано влияние ВЭКШ на ХЛ люминола при его галогенировании гипохлоритом HOCl. Видно, что ЖСК сильно ингибирует и хлорирование люминола, то есть компоненты экстракта ЖСК могут перехватывать гипохлорит.

Следует отметить, что активность МПО и образование ею АФКГ значительно зависит от pH и температуры: в кислой среде (pH ~5,0) и при 34–37°С преобладает галогенирующая активность МПО, а в нейтральной и щелочной среде – пероксидазная. Таким образом, в зависимости от условий среды может быть более существенным либо один, либо другой механизм, а ВЭКШ ингибирует и галогенирующую, и пероксидазную активность МПО.

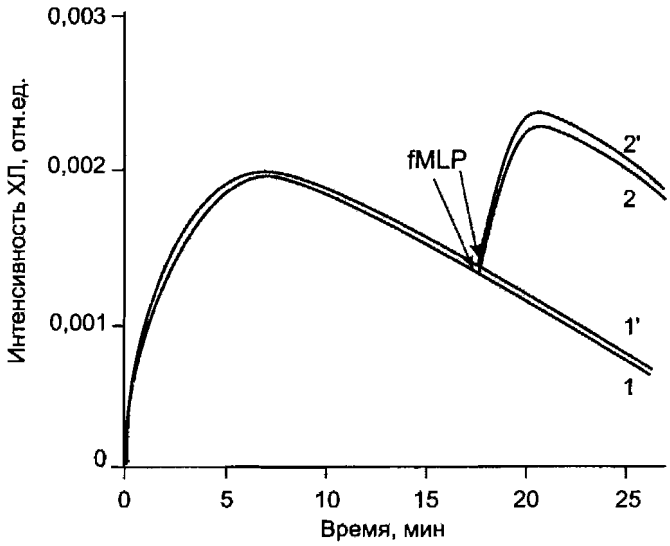


Рис. 9. **Кинетические зависимости люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов, инкубированных в присутствии ВЭКШ (1, 2) и в отсутствие ВЭКШ (1', 2') в течение 30 мин при 37°С. Степень разбавления ВЭКШ – 100 раз. 1, 1' – клетки стимулированы в ходе адгезии к стеклу, 2, 2' – при добавлении fMLP. pH=7,3, содержание нейтрофилов – 2,5 млн/мл.**

В аминокислотный состав ВЭКШ входят тирозин и таурин. Эти аминокислоты являются типичными физиологичными субстратами МПО и выявляются в фаголизосомах нейтрофилов, где осуществляется внутриклеточная деструкция патогенного материала [9]. Было показано, что богатые тирозином пептиды и белки могут связываться с активным центром МПО и ингибировать пероксидазную и галогенирующую активность фермента в отношении других субстратов. Вероятно, механизм антиоксидантного действия жидкого содержимого куколок также включает связывание компонентов ВЭКШ с реакционным центром МПО, что приводит к ингибированию ее активности.

Помимо активных форм кислорода и хлора чрезвычайно высокой реакционной способностью и токсичным действием в отношении биосистем обладают активные формы азота, в первую очередь, пероксинитрит $ONOO^-$, образование которого также имеет место при воспалении и при действии ксенобиотиков. Хемилюминесцентным методом мы показали, что компоненты ВЭКШ взаимодействуют с $ONOO^-$. Субстратом нитрования в смеси ЖСК, по-видимому, является тирозин, продуктом реакции – нитротирозин.

Действие водного экстракта куколок шелкопряда на проявления неспецифической резистентности

В экспериментах с культивированием клеток изучали влияние ВЭКШ на показатели фагоцитарного числа (ФЧ) и фагоцитарного индекса (ФИ) общепринятыми методами. Использовали разведения ВЭКШ в 10 и 100 раз. Установлено увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов крови: при разведении 1:100 показатели ФЧ увели-

чены на 7%, а ФИ – на 6,8%; при разведении 1:10 показатели ФЧ увеличены на 22% и ФИ – на 64,1%. Близкие результаты были получены при исследовании фагоцитарной активности перитонеальными макрофагами: при разведении 1:100 показатели ФЧ увеличены на 5,6% и показатели ФИ – на 11,0%; при разведении 1:10 показатели ФЧ увеличены на 20,9% и показатели ФИ – на 24,5%. Следовательно, при культивировании фагоцитирующих клеток препарат ВЭКШ способен дозозависимо стимулировать фагоцитоз.

Через 24 ч после однократного внутрибрюшинного введения препарата ВЭКШ (100 мг/кг) обнаружено увеличение относительной массы тимуса на 9,1% и относительной массы селезенки на 23,9%. При этом общее содержание лейкоцитов не меняется, но увеличивается количество эозинофилов на 75% и палочкоядерных лейкоцитов на 100% при уменьшении количества моноцитов. Количество сегментоядерных лейкоцитов сохраняется на постоянном уровне. При исследовании фагоцитоза нейтрофилов крови установлено повышение величин ФЧ на 19% и ФИ – на 70%.

Спустя сутки после десятикратного внутрижелудочного введения препарата ВЭКШ (100 мг/кг) крысятам массой 50–90 г установлено повышение относительной массы тимуса на 21% у подопытных животных. Но в то же время найдено уменьшение относительной массы селезенки на 3,9% и относительной массы печени – на 13%. За время введения препарата ВЭКШ количество лейкоцитов и лимфоцитов незначительно увеличилось (примерно на 2%), но вдвое увеличилось количество эозинофилов и на 54% количество моноцитов при резком уменьшении количества сегментоядерных лейкоцитов на 31,8%. Показатели фагоцитоза у нейтрофилов оказались повышенными: ФЧ на 23,4%, а ФИ на 34,1%.

Действие водного экстракта куколок шелкопряда на эмоционально-болевой стресс

Исследования были проведены на самках крыс Вистар массой 220–250 г на 6 экспериментальных группах. ВЭКШ (разведение 1:20) в 3 дозах (100, 500, 1000 мкл) вводился внутрибрюшинно за 1 час до стрессорного воздействия. В группе 5 ВЭКШ вводился за 1 час 40 минут до декапитации. Стрессорное воздействие проводилось в специально оборудованных клетках и включало одновременное импульсное раздражающее действие звукового зуммера, света и электрического тока, которое длилось на протяжении 40 минут. Затем животные были декапитированы. Для исследования взяты сыворотка крови, надпочечники, щитовидная железа.

Уровень кортикостерона в сыворотке крыс и надпочечниках (НП) измеряли методом ВЭЖХ на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром» (Россия), колонка 2×64 мм «Silasorb-600 LC» (Lachema, Чехия). В качестве подвижной фазы использовали гексан:хлороформ:метанол (7:1:1) [12]. Полученные данные статистически обработаны с использованием *U*-теста Манна–Уитни.

В табл. 3 представлены данные о концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс.

Таблица 3

Влияние острого стресса на концентрацию кортикостерона, массу надпочечников подопытных крыс

Группа животных	Масса надпочечников, мг	Концентрация кортикостерона, нмоль/л
Контроль (6)	50,1±4,05	493±37,7
100 мкл ВЭКШ+стресс (6)	45,8±0,98	867±81,8[1]
500 мкл ВЭКШ+стресс (6)	49,8±2,43	793±44,8[1]
500 мкл 0,15 М KCl+стресс (6)	48,4±1,08	864±56,0[1]
1000 мкл ВЭКШ (6)	50,9±2,26	840±74,2[1]
1000 мкл ВЭКШ+стресс (6)	51,9±2,12	879±64,2[1]

Примечание: в скобках указано количество животных. [1] – $P<0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, выраженных антистрессорных свойств ВЭКШ при введении его за 1 час до острого стрессорного воздействия не наблюдалось. Концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс при 40-минутном стрессорном воздействии повысилась на 75,2% по сравнению с контролем. Стрессорное повышение концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс, получивших внутрибрюшинно 100, 500 и 1000 мкл ВЭКШ, составило соответственно 75,8, 60,7 и 78,3% по сравнению с контролем, что практически не отличается от стрессорного эффекта у крыс, не получавших ВЭКШ. Однако хотелось бы обратить внимание на два факта. Во-первых, содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс, получивших 500 мкл ВЭКШ и 500 мкл 0,15 М KCl за час до стрессорного воздействия, различалось на 14,4%, хотя эти различия не достоверны из-за разброса данных. Кроме того, представляет значительный интерес факт стимулирующего действия высоких доз ВЭКШ на активность глюкокортикоидной функции надпочечников, поскольку через 100 мин после введения 1000 мкл ВЭКШ концентрация кортикостерона в сыворотке крови этих крыс была выше на 70,3% по сравнению с контролем и не отличалась от стрессированных крыс, получивших 1000 мкл ВЭКШ.

Действие водного экстракта куколок шелкопряда на синдром отмены этанола

В эксперименте использованы белые крысы гетерогенной популяции, находящиеся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Хроническую алкогольную интоксикацию (ХАИ) моделировали 28-дневным внутрижелудочным введением раствора этанола (25% раствор, 14 мл/кг в сутки двукратно через 12 ч). В течение последних 10 суток алкоголизации внутрижелудочно вводили ВЭКШ в дозе 10 мл/кг/сутки и препараты витамин B_{12} (160 мкг/кг/сут), триптофан (100 мг/кг/сут) в виде двух инъекций через 12 ч. Введение препаратов осуществляли через 20 мин после введения этанола. Последнее введение – за 12 ч до декапитации.

Определение свободных аминокислот (АК) проводили в хлорнокислых экстрактах плазмы крови и отделов головного мозга методом обращеннофазовой ВЭЖХ производных аминокислот с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445). Отделы мозга гомогенизировали в соотношении 1:10 в 0,2 М $HClO_4$, содержащей 1 мМ гомотаурина и 1 мкМ ванилиновой кислоты (внутренние стандарты), 20 мг/л ЭДТА и 50 мг/л метабисульфита натрия, затем центрифугировали при 4°С 15 мин при 20000 g, после чего супернатант немедленно отделяли от осадка. Условия определения: колонка Диасорб 130 C_{16}T, 3×150 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°С. Использовалась следующая 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 следовала нейтрализация путем добавления равного объема 0,1 М хлорной кислоты. Определение ароматических АК (тирозина и триптофана), а также биогенных аминов, их предшественников и метаболитов проводили методом ионпарной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм для триптофана). Условия определения: колонка Сепарон SGX C_{18}, 8 мкм, подвижная фаза – 0,1 М NaH_2PO_4, 17 мМ CH_3COOH, 20 мг/л ЭДТА, 180 мг/л октилсульфоната натрия, 230 мг/л гептилсульфоната натрия. Скорость потока 0,5 мл/мин, температура колонки 27°С. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A 10.01. Статистическая обработка данных была проведена с помощью программы Statistica 7,0.

В табл. 4 приведены результаты действия препаратов на содержание аминокислот в сыворотке крови крыс при синдроме отмены этанола (СОЭ). Этанол вызывает изменения в метаболизме по типу окислительного стресса.

Таблица 4

Влияние ВЭКШ на содержание аминокислот сыворотки крови при СОЭ (мкмоль/л)

Аминокислота	Контроль	СОЭ	СОЭ+B_{12}	СОЭ+Три	СОЭ+ВЭКШ
Таурин	315±49	350±33	301±36	224±28[2]	256±21
Треонин	177±23	122±16	74,6±16,7[1]	84,6±15,8[1]	153±17
Глутамин	3304±567	4149±432	2968±325	3413±347	2753±232[2]
Глицин	382±62	459±60	269±20[2]	213±31[1, 2]	286±15[2]
Тирозин	31,4±4,57	51,7±3,28[1]	36,1±3,53[2]	37,1±3,30[2]	58,5±4,72[1, 2]
Лизин	140±36	229±36	184±24	177±34	316±36[1, 2]
Гомоцистеин	12,2±3,96	22,3±10,9	22,3±6,89	40,1±9,71	7,61±1,60[2]

Примечание: [1] – достоверное отличие с контролем, [2] – достоверное отличие с группой крыс СОЭ.

Установлено, что препарат ВЭКШ оказал положительное действие путем сохранения концентрации гомоцистеина на уровне интактных крыс. Кроме того, этот препарат вызвал тенденцию к нормализации концентрации глутамина и обеспечил антиоксидантное действие посредством уменьшения концентрации прооксидантной аминокислоты глицина и увеличения концентрации антиоксидантных аминокислот тирозина и лизина.

В табл. 5 представлены изменения концентрации аминокислот в различных отделах мозга крыс при лечении СОЭ препаратом ВЭКШ.

Таблица 5

Влияние ВЭКШ на содержание аминокислот в мозге крыс при СОЭ (нмоль/г)

Аминокислота	Контроль	СОЭ	СОЭ+ВЭКШ
Эпифиз			
Таурин	1129±182	1008±344	2909±339[1, 2]
Аланин	330±59	338±67	943±239[1]
Средний мозг			
Треонин	638±58	421±35[1]	405±53[1]
Аргинин	152±14	125±10	95±9,0[1, 2]
ГАМК	3674±247	3321±233	1842±216[1, 2]
Триптофан	27±2,42	23±1,35	14±3,00[1, 2]
Мелатонин	0,07±0,014	0,05±0,016	0,03±0,003[1]
Кора мозга			
Аспартат	1874±75	2190±207	2380±90[1]
Глутамин	1817±251	1395±143	584±114[1, 2]
Тирозин	48±4,0	70±6,0[1]	73±5,0[1]
Триптофан	23±1,9	19±1,2	14±1,3[1, 2]
Стриатум			
Аспарагин	161±20	138±21	107±6,0[1]
Гистидин	106±9,0	89±10	35±6,0[1, 2]
Треонин	509±47	296±50[1]	371±37[1]
Таурин	8397±622	5185±480[1]	7145±389[2]
Аланин	1168±83	847±76[1]	1088±37[2]
Тирозин	62±5,0	67±7,0	85±5,0[1]
Дофамин	102±11	52±16[1]	107±8,0[1]
Триптофан	25±1,8	17±1,4[1]	16±2,4[1]
Серотонин	3,4±0,27	2,3±0,34[1]	3,6±0,34[2]
Гипоталамус			
Аспартат	1822±140	1175±120[1]	731±150[1, 2]
Глутамат	11542±822	7651±750[1]	4839±534[1, 2]
ГАМК	2662±163	2024±166[1]	1914±159[1]
Тирозин	75±5,0	83±5,0	95±4,6[1]
Триптофан	33±5,0	22±2,0	17±2,0[1]

Примечание: см. табл. 4.

В табл. 5 представлены достоверные изменения концентраций аминокислот в различных отделах мозга. Препарат ВЭКШ оказал наиболее выраженное положительное действие в стриатум: поддержание на нормальном уровне концентрации таурина, аланина, дофамина и серотонина. Следует обратить внимание на тот факт, что препарат ВЭКШ способствовал повышению концентрации аминокислот, которые способны оказывать антиоксидантное действие, например, таурин в эпифизе и стриатум, а также тирозин в коре, стриатум и гипоталамусе.

Таким образом, водный экстракт гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда обладает выраженным антиоксидантным действием, ингибирует пероксидазную и галогенирующую активность МПО нейтрофилов, перехватывает гипохлорит и пероксинитрит, но не ингибирует образование супероксида НАДФН-оксидазой. Можно предположить, что водный экстракт жидкого содержимого куколок китайского дубового шелкопряда или его определенные компоненты могут быть эффективны в терапии заболеваний, связанных с оксидативным или нитрозативным стрессом и с участием МПО. Проведенные исследования на экспериментальных животных продемонстрировали, что данное предположение справедливо при моделировании процессов окислительного стресса. Однако, опыты in vivo показали также, что для получения абсолютно достоверных результатов необходимы дальнейшие исследования состава этого уникального биологического объекта, каким являются куколки китайского дубового шелкопряда.

Литература

1. Nathan C. Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities // Nat. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 6. – P. 173–182.
2. Aratani Y. Role of Myeloperoxidase in the Host Defense against Fungal Infection // Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2006. – Vol. 47, № 3. – P. 195–199.
3. Arnhold J. Review: properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase // Biochemistry (Moskow). – 2004. – Vol. 69, № 1. – P. 4–9.
4. Babior B.M. NADPH oxidase: an update // Blood. – 1999. – Vol. 93, № 5. – P. 1464–1476.
5. Kavalenka A.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N., Smirnova E.N. and Gerein V. Systems of reactive oxygen species generation in human neutrophils: chemiluminescent analysis // Clin. Lab. – 2003. – Vol. 49, № 9/10. – P. 566.
6. Kavalenka A.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro // Cell Tissue Biol. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 551–559.
7. Welte T., Groneberg D.A. Asthma and COPD // Exp. Toxicol. Pathol. – 2006. – Vol. 57, suppl. 2. – P. 35–40.

8. Exner M., Minar E., Mlekusch W., Sabeti S., Amighi J., Lalouschek W., Maurer G., Bieglmayer C., Kieweg H., Wagner O., Schillinger M. Myeloperoxidase Predicts Progression of Carotid Stenosis in States of Low High-Density Lipoprotein Cholesterol // J. Am. Coll. Cardiol. – 2006. – Vol. 47. – P. 2212–2218.
9. Stanbro W.D. A kinetic model of the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride ion system in phagosome // J. Theor. Biol. – 1998. – Vol. 193. – P. 59– 68.
10. Трокоз, В.А. Биологически активные продукты из дубового шелкопряда: аспекты использования с лечебно-профилактической целью / В.А. Трокоз, Т.Б. Аретинская, Н.В. Трокоз // Сборник тезисов 2 Всероссийской конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных. – М., 2006. – С. 21–28.
11. Трокоз В.А., Лотош Т.Д., Абрамова А.Б., Аретинская Т.Б., Гухман Л.М. Способ получения лечебного экстракта. Авторское свидетельство СССР, № 1787439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).
12. Yamada, Y. Simple and convenient method for quantitation of corticosterone by high-performance liquid chromatography – ultraviolet detection / Y. Yamada, A. Aizawa // J. Pharmac. Methods. – 1984. – Vol. 11, № 4. – P. 291–297.

Поступило 02.10.2007