

Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования «Витебский государственный  
университет имени П.М. Машерова»

**Т.А. Толкачева**

**ГИСТОЛИЗ:  
ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА**

*Монография*

*Витебск  
ВГУ имени П.М. Машерова  
2015*

УДК 591.8:595.787  
ББК 28.666+28.691.89  
Т52

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 6 от 29.06.2015 г.

Одобрено научно-техническим советом ВГУ имени П.М. Машерова. Протокол № 6 от 10.06.2015 г.

Автор: доцент кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, кандидат биологических наук **Т.А. Толкачева**

Рецензенты:  
профессор кафедры химии УО «ВГАВМ»,  
доктор биологических наук *В.М. Холод*; заведующий кафедрой химии  
ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук,  
профессор *А.А. Чиркин*

**Толкачева, Т.А.**

**Т52** Гистолиз: теория и практика : монография / Т.А. Толкачева. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2015. – 136 с.  
ISBN 978-985-517-500-2.

В монографии рассмотрены вопросы о молекулярных механизмах гистолиза тканей *in vivo*, а также о химическом составе и биологической активности продуктов гистолиза на примере жизненного цикла дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.). В процессе гистолиза за счет распада макромолекул гемолимфа обогащается молекулами, в том числе аминокислотами антиоксидантного, проапоптотического и регулирующего рост клеток действия. Полученные результаты вносят значительный вклад в развитие представлений об эндогенной антиоксидантной системе, защищающей гемолимфу куколок дубового шелкопряда на протяжении диапаузы. Обосновано использование ее компонентов для предотвращения последствий окислительного стресса у других живых систем. Анализ аминокислотного состава фракций гемолимфы куколок является основой для создания модельных смесей аминокислот, обеспечивающих антиоксидантные и ростостимулирующие эффекты при стрессе растений.

УДК 591.8:595.787  
ББК 28.666+28.691.89

ISBN 978-985-517-500-2

© Толкачева Т.А., 2015  
© ВГУ имени П.М. Машерова, 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	10
1.1 Активные формы кислорода, их образование и анализ ...	11
1.2 Генерация митохондриями свободных радикалов .....	15
1.3 Последствия взаимодействия активных форм кислорода с клеточными мишенями .....	16
1.4 Антиоксидантная система .....	19
1.5 Окислительный стресс и его последствия .....	22
1.6 Эндогенные антиоксиданты и продукты гистолиза .....	24
<b>ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	27
2.1 Методы получения и исследования химического состава продуктов гистолиза .....	30
2.1.1 <i>Получение гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда</i> .....	30
2.1.2 <i>Методика разделения гемолимфы на фракции</i> .....	30
2.1.3 <i>Способы определения содержания аминокислот</i> ...	31
2.1.4 <i>Методы определения показателей гемолимфы куколок на протяжении диапаузы</i> .....	33
2.1.5 <i>Определение жизнеспособности клеток жирового тела и гемолимфы</i> .....	33
2.2 Методы исследования биологической активности на клеточных культурах .....	34
2.2.1 <i>Генерация нейтрофилами активных форм кислорода</i> .....	34
2.2.2 <i>Определение активности миелопероксидазы</i> .....	35
2.2.3 <i>Определение цитотоксичности гемолимфы и препаратов на ее основе</i> .....	36
2.2.4 <i>Влияние фракций гемолимфы на культивирование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс</i> .....	36
2.2.5 <i>Оценка цитотоксичности фракций гемолимфы с использованием культур клеток Нер G2</i> .....	37
2.3 Методы биохимических исследований биологической активности продуктов гистолиза на тканевом уровне .....	39
2.3.1 <i>Получение лимфоцитов из тканей растущих крыс</i> .	39
2.3.2 <i>Проращивание растительных тест-объектов в лабораторных условиях</i> .....	40
2.3.3 <i>Определение биохимических показателей растительных тест-объектов</i> .....	41
2.3.4 <i>Молекулярно-генетические методы исследования растительных тканей</i> .....	42
2.4 Статистическая обработка результатов исследований ....	43

<b>ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИДКОГО СОДЕРЖИМОГО КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА .....</b>	<b>44</b>
3.1 Роль апоптоза в формировании гемолимфы куколок .....	45
3.2 Биохимические изменения в гемолимфе куколок на протяжении диапаузы .....	47
3.3 Белки и аминокислоты гемолимфы куколок .....	50
3.4 Гистолиз тканей и антиоксидантная активность гемолимфы куколок .....	57
<b>ГЛАВА 4 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОДЕРЖИМОГО КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ .....</b>	<b>70</b>
4.1 Антиоксидантная активность гемолимфы куколок и окислительный стресс .....	70
4.2 Влияние аминокислотного состава фракций гемолимфы на количество делений мезенхимальных стволовых клеток .....	72
4.3 Разделение ингибирующей и активирующей синтез ДНК активностей в гемолимфе куколок .....	75
4.4 Антиоксидантная активность фракций гемолимфы куколок .....	78
<b>ГЛАВА 5 ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ ГИСТОЛИЗА НА ТКАНЕВОМ УРОВНЕ .....</b>	<b>82</b>
5.1 Серосодержащие аминокислоты в тканях крыс после введения экстракта куколок дубового шелкопряда .....	82
5.2 Влияние экстракта куколок дубового шелкопряда на стресс, воспроизводимый в растительных тест-системах .....	87
5.3 Перспективы применения продуктов гистолиза .....	98
<b>ГЛАВА 6 АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>103</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>108</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....</b>	<b>111</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Изменение концентрации активных форм кислорода (АФК) – важное явление, регулирующее ответ клетки на действие многих физических и химических факторов: от регуляции физиологических процессов до повреждения биомолекул и структур. Эффект действия АФК в живых системах зависит от типа и концентрации присутствующих в среде антиоксидантов, проявляющих, в отличие от акцепторов электронов – окислителей, свойства восстановителей или доноров электронов [1, 2, 205]. Согласно современному определению, «окислительный стресс – это дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, ведущий к нарушению редокс-сигнализации и контроля и/или к повреждению макромолекул» [2, с. 98]. Основными источниками АФК являются митохондрии и эндоплазматический ретикулум. Известно, что  $O_2^-$  образуется за счет утечки электронов из комплексов I, II, III электронтранспортной цепи (ЭТЦ) переноса электронов к молекулярному кислороду [24–26]. Способны к генерации АФК многие митохондриальные ферменты, в частности аконитаза (АСО) и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, а также глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, моноаминоксидазы А и В, дигидрооротатдегидрогеназа и цитохром *b5* редуктаза [27–30, 37]. Внутримитохондриальные метаболиты  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , *NO* и *ONOO^-* являются прооксидантами, потенциально приводящими к окислительному стрессу [18, 47]. Кислородные радикалы и иные АФК вызывают модификации белков, нуклеиновых кислот и мембранных липидов [54]. Окисление высоконенасыщенных ацильных цепей фосфолипидов мембран снижает их сродство к цитохрому *c* (*syt-c*) и освобождает его в свободном состоянии. Это в сочетании с повышением проницаемости внешней митохондриальной мембраны к проапоптотическим членам семейства белков Bcl-2 приводит к выходу цитохрома *c* в цитозоль, формированию апоптосом и активации каскада каспаз, достигающей высшей точки при апоптозе [64]. АФК участвуют в запуске аутофагии чрезмерно поврежденных органелл, например, пероксисом, эндоплазматической сети и митохондрий [68, 69]. Увеличение образования АФК в покоящейся митохондрии представляет угрозу для этой органеллы и, соответственно, для жизнеспособности клетки, поскольку это приводит к открытию каналов митохондриальной мембраны, что сопровождается нарушением митохондриального мембранного потенциала и дальнейшим увеличением генерации электронтранспортной цепью АФК [25, 31, 32]. Достаточно детально изучен многофакторный и многоэтапный процесс взаимосвязи окислительного стресса с повреждением ДНК – влияние «кластогенных факторов» на цитогенетические показатели клеток [87–89].

Антиоксидантная система (АОС) выполняет защитную и регуляторную функции: инактивирует свободные радикалы, защищает организм от воздействия неблагоприятных факторов и является регулятором постоянства внутренней среды организма. Нарушение функции АОС сопровождается дисбалансом про/антиоксидантного гомеостаза, индукцией окислительного стресса и развитием необратимых патологических изменений в организме. Антиоксиданты делят на экзогенные и эндогенные [103].

В последние десятилетия интенсивно разрабатывается проблема антиоксидантной защиты организма. В рамках этого наименее изученным является вопрос о составе и реактивности эндогенных антиоксидантов при развитии окислительного стресса. Эндогенная АОС включает временные элементы, по сути, ксенобиотики, поступившие с пищей как вторичные метаболиты растений (полифенолы, биофлавоноиды и др.) или искусственно синтезированные антиоксидантные препараты (витамины С, А, Е, бета-каротин, «химические ловушки» АФК и др.), а также продукты экспрессии антиоксидантных генов и регуляторы их экспрессии (транскрипционные факторы, эндогенные энхансеры и сайленсеры и др.). Решение вопроса об эндогенных антиоксидантах требует достаточно обширных исследований и носит междисциплинарный характер [2, 4, 12, 205]. На первых этапах целесообразно найти природный объект, имеющий эволюционно отобранный механизм эндогенной антиоксидантной защиты, расшифровка которого может стать матрицей для создания препаратов целенаправленного воздействия на эндогенную АОС других организмов. Исследование этого вопроса на данном этапе решения может включать эксперименты на доступных и позволяющих получить адекватную информацию объектах: исследование состава и биологической активности гемолимфы куколок дубового шелкопряда (донор эндогенной АОС) и изучение биологической активности ее на клеточных и тканевых моделях (акцепторы компонентов эндогенной АОС).

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось создание на основе выявленного химического состава содержимого куколок дубового шелкопряда композиций антиоксидантов и определение биохимических эффектов их действия на нормальные, трансформированные клетки и тканевые системы.

В ходе исследования были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать компоненты антиоксидантного комплекса гемолимфы куколок дубового шелкопряда и ее фракций.
2. Оценить действие гемолимфы и ее фракций на эритроциты и нейтрофильные лейкоциты крови человека, лимфоциты тканей крыс, фибробласты кожи человека, стволовые клетки жировой ткани крысы и трансформированные клетки линии Нер G2.

3. Установить возможные биохимические механизмы воздействия гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда на эндогенные антиоксидантные системы других живых объектов и разработать новые способы практического применения экстракта куколок и искусственных аминокислотных смесей на основе фракций их гемолимфы.

Объекты исследования: жидкое содержимое куколок, экстракт куколок, фракции гемолимфы куколок дубового шелкопряда (китайской дубовой павлиноглазки) (*Antheraea pernyi* G.-M.), искусственные аминокислотные композиции. Выбор объектов исследования обусловлен необходимостью установления природы продуктов гистолиза, отвечающих за антиоксидантную активность. Это позволит применять их для предупреждения или уменьшения биохимических проявлений стресса на клеточном и тканевом уровнях других организмов. В работе использованы объекты четырех уровней сложности: 1) нативная гемолимфа куколок дубового шелкопряда (ГКДШ), содержащая весь комплекс продуктов гистолиза; 2) экстракт куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ), полученный трехкратным кипячением с 0,9% раствором NaCl, содержащий термостабильные низкомолекулярные вещества; 3) фракции гемолимфы, полученные методом гель-фильтрации на сефадексе G25 fine, в результате чего отделение полимерных молекул от мономерных происходит без термического воздействия; 4) созданные искусственные аминокислотные композиции на основе качественного и количественного состава аминокислот во фракциях гемолимфы.

Изучали химический состав содержимого куколок шелкопряда и его цитотоксичность; биохимические механизмы действия гемолимфы и ее фракций; генерацию активных форм кислорода нейтрофилами; показатели окислительного стресса; экспрессию генов синтеза стрессовых белков растений ( $\beta$ -глюкозидазы, фосфолипазы D и фитохрома A).

Предмет исследования включает изучение природы жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда, для чего использован комплекс структурно-биохимических (хроматографических, спектрофотометрических, ферментативных, изотопных и цитохимических) и функционально-биохимических (хемилюминесцентный анализ нейтрофильных лейкоцитов, спектр аминокислот лимфоцитов тканей, перекисное окисление липидов мембран эритроцитов, рост и метаболизм фибробластов, клеток гепатомы Нер G2, стволовых клеток жировой ткани крыс, биохимические критерии окислительного стресса простых растительных тест-систем) методов. Этот комплекс предназначен для достижения фундаментального (механизмы образования и химического состава гемолимфы) и прикладного (обоснование антиоксидантных препаратов на ее основе) аспектов цели исследования.

В результате исследования установлено, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда формируется в процессе запрограммированной гибели клеток и в периоде диапаузы накапливает антиоксидантный

потенциал за счет разрушения макромолекул. Гемолимфа и ее фракции не оказывают цитотоксического действия на нормальные фибробласты кожи. Лизин- и аргининсодержащие фракции гемолимфы ускоряют рост нормальных фибробластов кожи и растительных клеток. На трансформированные клетки (гепатома Нер G2) и недифференцированные клетки (стволовые клетки жировой ткани крысы) фракции гемолимфы оказывают цитотоксическое и проапоптотическое действие. Фракции, содержащие лизин, подавляют, а содержащие гистидин активируют включение меченного тимидина в ДНК клеток Нер G2. Эти аминокислоты играют важную роль в механизме смены фаз гистолиза и гистогенеза в процессе диапаузы.

Антиоксидантное действие гемолимфы куколок дубового шелкопряда на несколько порядков превышает аналогичное действие гемолимфы виноградных улиток, гомогената расплода пчел и экстрактов лекарственных растений. Противокислительная активность выявлена во фракциях макромолекул, пептидов и низкомолекулярных биорегуляторов. Гемолимфа и ее фракции подавляют образование активных форм кислорода при активации нейтрофильных лейкоцитов, стимуляции перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов и действию окислительного стресса в растительных тест-системах. Ее гидрофильные компоненты напрямую аффицируют зависимые от миелопероксидазы реакции без повреждения цитоплазматических мембран, а также посредством стимуляции каскадов внутриклеточной сигнализации (фосфатидил-инозитольный и липоксигеназные пути).

Показано, что внутрижелудочное введение растущим крысам экстракта куколок дубового шелкопряда усиливает эндогенную антиоксидантную систему тканей за счет увеличения концентрации цистеина, таурина и цистатионина в лимфоцитах печени, селезенки и тимуса. Предварительная обработка семян экстрактом шелкопряда предупреждает развитие окислительного стресса на ранних этапах онтогенеза растений за счет уменьшения образования продуктов перекисного окисления липидов и возможного модулирующего действия на экспрессию генов стрессовых белков –  $\beta$ -глюкозидазы, фосфолипазы D и фитохрома A. Рост растений интенсифицируется аминокислотными смесями, созданными на основе фракций гемолимфы.

За помощь и поддержку при выполнении работы автор выражает искреннюю благодарность доктору биологических наук, профессору А.А. Чиркину, доктору медицинских наук, профессору Е.О. Данченко, кандидату биологических наук, доценту И.И. Концевой.

Опыты по изучению влияния гемолимфы и ее фракций на рост и биосинтез ДНК в культурах фибробластов и клеток Нер G2 проведены с использованием оборудования лаборатории медицинской биотехнологии НИИ биомедхимии РАМН имени В.Н. Ореховича (г. Москва) совместно с доктором биологических наук О.Ю. Абакумовой; иссле-

дование проапоптотического действия веществ гемолимфы на ее клетки, на клетки жирового тела и стволовые клетки жировой ткани крыс осуществлены в ЦНИЛ БелМАПО (г. Минск) совместно с кандидатом биологических наук М.М. Зафранской; хемилюминесцентный анализ стимулированных нейтрофильных лейкоцитов при внесении гемолимфы и ее фракций, гомогената расплода пчел и лекарственных растений реализован на оборудовании кафедры биофизики БГУ (г. Минск) совместно с кандидатом биологических наук Е.И. Коваленко; влияние ЭКДШ на экспрессию генов 3-х растительных белков установлено в лаборатории группы молекулярной биологии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (г. Минск) совместно с кандидатом биологических наук Г.В. Ляхновичем, что отражено в совместных публикациях.

Тема монографии соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 гг. («Супрамолекулярная биология, химический синтез новых веществ и материалов с заданной структурой, функциональными и физико-химическими свойствами. Новые химические продукты и технологии»; «Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты»).

Работа выполнена на базе кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова в рамках ГПНИ «Природно-ресурсный потенциал» по теме задания 5.2.22 «Оценка современного состояния биоразнообразия и ресурсного потенциала Белорусского Поозерья как основа для его сохранения и рационального использования» (№ госрегистрации 2011877); 2-х грантов БРФФИ: «Биохимическое обоснование и биотехнология антиоксидантных и бактериостатических препаратов из гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда» (№ госрегистрации 20092185, 15.04.2009 г. – 31.03.2011 г.); «Научное обоснование биотехнологии препаратов природного происхождения на основе биоресурсов Витебской области» (№ госрегистрации 20113642, 15.04.2011 г. – 31.12.2012 г.); 2-х грантов Министерства образования: «Способ коррекции нарушений обмена веществ при моделировании инсулинорезистентности» (№ госрегистрации 20100705, 01.01.2010 г. – 31.12.2010 г.); «Способ защиты растений от окислительного стресса, вызванного солями тяжелых металлов, путем использования гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда» (№ госрегистрации 20121178, 01.01.2012 г. – 31.12.2012 г.).

## ГЛАВА 1

### АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Формирование кислородной атмосферы на Земле в интервале 1,9–1,7 млрд лет тому назад привело к развитию механизмов аэробного превращения веществ, что позволило поднять биоэнергетику живых организмов на качественно новый уровень и существенно ускорить эволюционный процесс. Однако одновременно образовывались вредные для мембран и макромолекул свободнорадикальные продукты, для обезвреживания которых формировались системы неферментативной и ферментативной антиоксидантной защиты [1, с. 8, 9]. Согласно С.Н. Черенкевичу и соавт., основные типы окислителей в живых системах представлены производными метаболизма кислорода, для обозначения которых рекомендуется использовать термин «активные формы кислорода», хотя существуют понятия «активные метаболиты кислорода» (АМК) и «низкомолекулярные кислородные интермедиаты». Изменение концентрации АФК – важное явление, регулирующее ответ клетки на действие многих физических и химических факторов: от регуляции физиологических процессов до повреждения биомолекул и структур. Эффект действия АФК в живых системах зависит от типа и концентрации присутствующих в среде антиоксидантов, проявляющих, в отличие от акцепторов электронов окислителей, свойства восстановителей или доноров электронов. Среди многих определений антиоксидантов наиболее простой и точной является формулировка Б. Халливела и Дж. Гаттериджа (2007 год): «Антиоксидант – любое вещество, которое задерживает, предотвращает или удаляет окислительное повреждение молекулы-мишени». В настоящее время участие АФК показано в патогенезе более чем 200 заболеваний и патологических процессов (старение, дифференцировка клеток, экспрессия генов и др.). Для оценки соотношения активных форм кислорода и антиоксидантов в 1985 году Х. Зисом был введен термин «окислительный стресс» – «нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых», спустя 6 лет появилось существенное дополнение – «...которое может привести к повреждению». В 2006 г. Д. Джонс определил окислительный стресс как нарушение редокс-сигнализации и контроля. Современная формулировка: «Окислительный стресс – это дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, ведущий к нарушению редокс-сигнализации и контроля и/или к повреждению макромолекул». Итак, в настоящее время повреждение биосистем может обсуждаться на основе свободнорадикальной или редокс-гипотез. Поскольку АФК и антиоксиданты следует рассматривать как группу функционально связанных соединений, для их харак-

теристики предложен термин «редокс-активные молекулы» [2, с. 94, 98]. Исследования в области окислительного стресса имеют не только теоретическое значение, но и большой практический смысл, например, в медицине [3].

### 1.1 Активные формы кислорода, их образование и анализ

В основе многих заболеваний человека и животных лежат изменения структурно-функциональных свойств белков, нуклеиновых кислот, биомембран под действием факторов внешней среды физической, химической, биологической природы. К таким факторам могут быть отнесены ионизирующее и УФ-излучение, токсины, яды, фармакологические агенты, аллергены, патогенные микроорганизмы. В качестве ключевых агентов в организме, обуславливающих развитие патологии, могут выступать АФК [4–9]. Активные формы кислорода обладают высокой реакционной способностью, коротким временем жизни, поэтому их непосредственный химический анализ практически невозможен. В таблице 1 приведены некоторые данные, характеризующие АФК.

Таблица 1 – АФК в организмах млекопитающих: образование, свойства, утилизация [10]

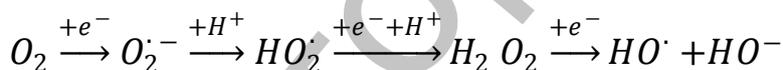
Форма АФК, время жизни, радиус действия	Механизмы образования в живых системах	Биологическое действие	Ингибиторы
Супероксид-анион-радикал, $O_2^{\cdot-}$ , $10^{-6}$ с, 0,3 мкм	Одноэлектронное восстановление кислорода ксантинооксидазой, НАДФН-оксидазой фагоцитов, оксидазами аминокислот, образование в цепи транспорта электронов митохондрий и микросом, окисление гемоглобина	Индукция перекисного окисления липидов (ПОЛ), образование $HO^{\cdot}_2$ , $^1O_2$ , $HO^{\cdot}$ , $H_2O_2$ , разрушение мембран эритроцитов, усиление пролиферации лимфоцитов, вазомоторное действие, регуляторное действие	Супероксид-дисмутаза (СОД), аскорбиновая кислота, церулоплазмин, глутатион, фенолы
Пергидроксильный радикал $HO^{\cdot}_2$ , $10^{-3}$ с, 10 мкм	Присоединение $H^+$ к $O_2^{\cdot-}$ в кислой среде, реакция с органическими пероксидами, промежуточный продукт в реакциях восстановления флавинов с $O_2$	Индукция ПОЛ, цитотоксическое действие, образование $H_2O_2$ и $O_2^{\cdot-}$ при взаимодействии с органическими молекулами	Аскорбиновая кислота, мочевая кислота (МК), убихинон, $\alpha$ -токоферол

Пероксид водорода $H_2O_2$ , стабилен	Двухэлектронное восстановление кислорода ксантинооксидазой и флавиновыми оксидазами, реакция дисмутации $O_2^{\cdot-}$ с участием или без участия СОД	Цитотоксическое действие, образование $HO$ в реакциях типа Фентоновской, локальное закисление среды, сосудосуживающее действие, ингибирование пролиферации лимфоцитов	Внутриклеточные каталаза (КТ) и глутатионпероксидаза, церулоплазмин
Гидроксильный радикал $HO$ , $10^{-9}$ с, менее 10 нм	Разложение $H_2O_2$ ионами металлов переменной валентности (реакция Фентона), действие ионизирующего излучения на $H_2O$	Сильный окислитель, индуцирующий разрыв СН-связей, индуктор ПОЛ, вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот, оказывает сильное цитотоксическое, канцерогенное, мутагенное действие	Одно- и многоатомные спирты, аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, тиомочевина, урацил, диметилсульфоксид, мелатонин
Синглетный кислород $^1O_2$ , $10^{-6}$ с, 0,3 мкм	Фотоиндуцированные реакции, сопутствующий продукт в реакциях с пероксидазами, образуется при спонтанной дисмутации $O_2^{\cdot-}$	Индукция ПОЛ, вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот, оказывает сильное цитотоксическое и мутагенное действие	Каротиноиды, азиды, токоферол, алкены, производные фурана, ароматические углеводороды, холестерин, гистидин, аскорбиновая и мочевиная кислота
Гипогалоиды, $OCl^-$ , $OBr^-$ , $OI^-$	Реакция с $H_2O_2$ , миелопероксидазой (МПО) лейкоцитов, пероксидазой эозинофилов, лактопероксидазой, тиреопероксидазой	Индукция ПОЛ, вызывает инактивацию ингибиторов протеаз, оказывает цитотоксическое действие	Церулоплазмин, мочевиная кислота, альбумин, аминокислоты (аланин, серин, валин, глицин)
Пероксидный радикал $RO_2^{\cdot}$ , 10 с	Взаимодействие $O_2$ с органическими радикалами, реакции $O_2^{\cdot-}$ , $^1O_2$ , $HO^{\cdot}$ , $RO^{\cdot}$ с ненасыщенными жирными кислотами липидов	Образование алкильных радикалов липидов и гидропероксидов	$\alpha$ -токоферол, убихинон, аскорбиновая и мочевиная кислота
Алкоксильный радикал $RO^{\cdot}$ , $10^{-6}$ с	Разложение органических пероксидов ионами металлов переменной валентности	Индукция ПОЛ, оказывает цитотоксическое и канцерогенное действие	$\alpha$ -токоферол, убихинон, аскорбиновая и мочевиная кислота

Моноксид азота (II) $NO \cdot$ , стабилен	Работа NO-синтаза (NOS)	Регуляция тонуса сосудов	Пероксидазы, гемовые белки
Пероксинитрит $ONOO^-$ , $10^{-9}$ с	Реакция взаимодействия $O_2^{\cdot-}$ с $NO \cdot$	Индукция ПОЛ, оказывает сильное цитотоксическое, мутагенное и 13 аннцерогенное действие	—

Следует отметить, что в настоящее время АФК и другие свободные радикалы рассматриваются не только как деструктивные агенты, приводящие к повреждениям и развитию патологий, но и как необходимые регуляторные молекулы (соединения), участвующие в управлении функционированием организма. При этом речь идет о небольших количествах АФК и других радикалов [11, 12].

В результате последовательного одноэлектронного восстановления кислорода, кроме  $H_2O_2$  и воды, возникают чрезвычайно реакционноспособные свободнорадикальные производные, такие, как супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и гидроксильный ( $HO \cdot$ ) радикал, синглетный кислород ( $^1O_2$ ) [13]:



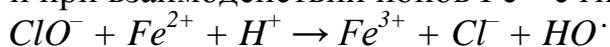
Основным источником внутриклеточной генерации супероксидного радикала являются митохондрии, где 2% от потребляемого  $O_2$  восстанавливаются в  $O_2^{\cdot-}$ . Дополнительным источником  $O_2^{\cdot-}$  могут выступать компоненты микросомальной электронтранспортной цепи (преимущественно цитохром P450). Образующийся в ходе одноэлектронного восстановления кислорода супероксидный анион-радикал диспропорционирует (дисмутирует) в присутствии протонов до гидропероксидного радикала:



Протонированная форма способна проникать в липидное окружение, преодолевать мембранные барьеры клеток, диссоциируя в замембранном пространстве. В этих условиях  $HO_2 \cdot$  может выступать инициатором цепных реакций перекисного окисления липидов биологических мембран. Наиболее разрушительным из всех токсических форм кислорода является гидроксильный радикал. Инициаторами его образования из  $H_2O_2$  являются ионы двухвалентного железа (реакция Фентона):



$H_2O_2$  – стабильный продукт восстановления  $O_2^{\cdot-}$ , его цитотоксический эффект реализуется в присутствии соответствующих доноров электронов через образование гидроксильного радикала, образуя и при взаимодействии ионов  $Fe^{2+}$  с гипохлоритом:



Как показали кинетические исследования, по своей реакционной способности гидроксильный радикал превосходит атомарный кислород (почти в 300 раз) и гидропероксильный радикал. Он чрезвычайно химически активен, взаимодействует с органическими молекулами и многими неорганическими ионами. Гидроксильный радикал легко проникает в гидрофобный липидный слой и вступает в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав биологических мембран и липопротеинов плазмы крови, образуя липидные радикалы и инициируя цепные реакции перекисного окисления липидов [14].

В ходе ПОЛ на стадии образования свободных радикалов в молекулах гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей. Молекулы с двумя сопряженными двойными связями – диеновые конъюгаты (ДК), которые обнаруживаются спектрофотометрически. Образующиеся диеновые гидропероксиды нестабильны и вступают в реакции с образованием ТБК-реагирующих соединений (ТБКРС) (в том числе малонового диальдегида),  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных альдегидов: акролеина, 4-гидрокси-2-алкеналей, а также  $\alpha$ -гидроксиальдегидов. Продукты ПОЛ изменяют физические свойства липидного бислоя мембран клеток, тем самым снижая активность мембранных ферментов, усиливают гидратацию поверхности клетки, модифицируют проводимость мембраны для ионов и малых молекул [15].

К методам регистрации АФК ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $HOCl$ ,  $^1O_2$ ,  $NO$ ,  $ONOO^-$ ) относятся: метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), позволяющий выявлять молекулы, атомы, ионы с неспаренными электронами, метод люминесцентных зондов с использованием индикаторных соединений, у которых изменяются параметры люминесценции при взаимодействии с АФК, спектрофотометрический анализ продуктов, возникающих в результате действия АФК. В качестве индикаторов формирования активных форм кислорода используются мембранопроникающие и мембранонепроницающие вещества [16]. Люминол (Люм) и люцигенин (Люц) вступают в химическое взаимодействие с АФК, в результате чего образуются продукты в возбужденном энергетическом состоянии, растрачивающие избыток энергии путем излучения квантов света (сине-фиолетовая область спектра). Такое явление называется хемилюминесценцией (ХЛ), причем люцигенин является зондом на  $O_2^{\cdot-}$ , а люминол – на  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $HOCl$ ,  $^1O_2$ . Люминол легко проникает

через мембраны и отражает процессы генерации АФК и снаружи, и внутри клеток; для регистрации внеклеточной продукции АФК используют непроникающий через мембраны изолюминол.

## 1.2 Генерация митохондриями свободных радикалов

Главным источником активных форм кислорода в клетке является митохондриальное дыхание [17]. Предполагают, что в сердце и печени крысы на митохондриальную продукцию  $H_2O_2$  расходуется  $\approx 0,5\%$  от общего количества физиологического органного потребления  $O_2$  при использовании в качестве субстратов сукцината или мала-та-глутамата [18, 19, 20]. Стехиометрическим предшественником митохондриального  $H_2O_2$  является супероксидный анион-радикал, а главным источником образования  $O_2^{\cdot-}$  в митохондриях признано аутоокисление убисемихинона ( $QH$ ) [21–23]. В настоящее время известно, что  $O_2^{\cdot-}$  образуется за счет утечки электронов из комплексов I, II, III электронтранспортной цепи переноса электронов к молекулярному кислороду [24–26]. Способны к генерации АФК и многие митохондриальные ферменты, в частности аконитаза и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа и глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, дигидроорататдегидрогеназа, моноаминоксидазы (А и В) и цитохром  $b_5$  редуктаза [27–30]. Большим прорывом в этой области была демонстрация кинетики образования  $O_2^{\cdot-}$  в митохондриях живых клеток или органов [31–40]. Потоки ионов через внутреннюю митохондриальную мембрану также оказывают сильное воздействие на скорость образования  $H_2O_2$ , указывая на регулируемую роль мембранного потенциала в процессе аутоокисления  $UQH$  [41].

Синтез оксида азота  $NO$  осуществляется в ферментативной реакции, катализируемой  $NO$ -синтазой. Митохондриальный  $NO$  производится митохондриальной изоформой  $NO$ -синтазы (mtNOS). Физиологическая продукция  $NO$  ферментом взаимосвязана с регулированием  $cyt-c$ -оксидазной активности: повышение уровня  $NO$  снижает  $cyt-c$ -оксидазную активность за счет  $S$ -нитрозилирования остатков цистеина в комплексах IV и I [42–44]. В состоянии разобщения катализируемых ферментом процессов восстановления кислорода и синтеза  $NO$  эндотелиальная NOS (eNOS) генерирует супероксидный анион-радикал [45, 46]. Внутримитохондриальные метаболиты  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO$  и  $ONOO^-$  являются прооксидантами, потенциально приводящими к окислительному стрессу. Два из них,  $O_2^{\cdot-}$  и  $NO$ , являются свободными радикалами; однако, в силу своей слабой реакционности, они не участвуют в реакциях «разветвления цепи», а только в реакциях «обрыва цепи», приводящих к образованию  $H_2O_2$  и  $ONOO^-$ . Последние два соединения потенциально опасны, так как после гомолитического рас-

щепления участвуют в генерации высокореактивного гидроксильного радикала ( $HO \cdot$ ) и свободного радикала  $NO_2$ , который включается в нитрование белка [18, 47].

Пероксинитрит – сильный окислитель, который, как заряженная форма  $NO$ , быстро диффундирует из внутримитохондриального пространства. Пероксинитрит ингибирует комплексы I и III [48, 49]; эффекты необратимы, поддержание высокого уровня  $ONOO^-$  приводит к митохондриальной дисфункции и апоптозу [50–53]. Все вышеизложенное доказывает, что главным источником АФК в клетках являются митохондрии [17].

### **1.3 Последствия взаимодействия активных форм кислорода с клеточными мишенями**

Кислородные радикалы и иные АФК вызывают модификации белков [54]. Такие окислительные модификации ведут к изменениям функции белков, химическому фрагментированию или повышенной уязвимости к протеолитической атаке [55–57], осуществляемой главным образом протеасомами. При окислительном стрессе атаке АФК, прежде всего, подвергаются белки плазматических мембран (полипептидная цепь и боковые аминокислотные остатки), что может сопровождаться разрывом пептидной цепи и образованием стабильных метаболитов аминокислот. Ароматические аминокислоты наиболее чувствительны к окислению АФК. Фенилаланин превращается в моно- и дигидроксипроизводные, тирозин – в 3,4-дигидроксипроизводное. Эти соединения могут подвергаться обратимому окислению/восстановлению и генерировать радикалы, которые способны взаимодействовать между собой с образованием дитиозинов, что может приводить к внутри- и межмолекулярным сшивкам пептидов. Окисление остатков лизина, аргинина, гистидина, пролина, треонина, глутаминовой и аспарагиновой кислот приводит к образованию карбонильных групп, которые могут быть введены в белки при их взаимодействии с продуктами окисления углеводов (реакции гликозилирования и гликооксидации) и продуктами окисления липидов (малоновый диальдегид, 2- и 3-ненасыщенные альдегиды). Образование 2,2'-бифенильных производных является маркером индуцированных АФК повреждений белков. Внутриклеточный уровень окисленных белков определяется балансом между скоростью окисления белков и скоростью деградации окисленных белков. Этот баланс является функцией множества факторов генерации АФК и факторов, определяющих концентрацию и активность протеаз, разрушающих поврежденные молекулы. Окисленные формы некоторых белков (модифицированные при гликозилировании или продуктами

ПОЛ, агрегаты белков) стабильны для протеолиза, они могут ингибировать протеолиз окисленных форм других белков [15, 58].

В обычных условиях невысокая стабильность и неспособность АФК проникать через бислои мембранных липидов создают эффективный экран, препятствующий распространению окислительного повреждения. Однако в реакциях с полиненасыщенными жирными кислотами митохондриальных липидов АФК образуют гидроперекиси,  $\alpha$ -,  $\beta$ -ненасыщенные альдегиды, например, 4-гидрокси-2-ноненаль (HNE), которые, обладая высокой электрофильностью, достаточно стабильны, способны распространяться между клеточными компартментами и взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами [59]. Иницилируемые АФК цепные реакции ПОЛ играют важную роль в патогенезе атеросклероза, повреждений, вызываемых ишемией/реперфузией, в развитии стресс-индуцированного преждевременного старения [33, 34, 38].

Митохондриальный фермент аконитаза 2 – одна из важнейших мишеней митохондриального окислительного стресса. Аконитаза 2 (ACO-2) – Fe-S-содержащий белок, который катализирует изомеризацию цитрата в изоцитрат в цикле Кребса. Структурная склонность центра Fe-S-белка в ACO-2 к формированию АФК и пероксинитрита [60] может частично объяснять селективную уязвимость фермента. Известно, что ACO-2 является специфической мишенью окислительного повреждения в процессе старения [61]. Показано, что длительное экспонирование митохондрий с оксидантом приводит к разрушению кластера  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , карбонилиции и деградации фермента [62]. Истощение ACO-2 должно ингибировать цикл Кребса. При этом избыток пирувата преобразуется в лактат с участием лактатдегидрогеназы (ЛДГ). В ингибирование цикла Кребса вносит вклад снижение экспрессии гена фермента еноил-КоА-гидратазы [63].

Анионные фосфолипиды внутренней митохондриальной мембраны, обогащенные в контактных участках с внешней митохондриальной мембраной кардиолипином, представляют собой одну из главных мишеней окислительного стресса [64].

Известны три основных механизма гибели клеток: некроз, апоптоз и аутофагия. Аутофагия – один из механизмов, защищающих клетки от воздействия окислительного стресса. Это – отрегулированный лизосомальный путь, обеспечивающий лизис и восстановление окисленных белков и поврежденных органелл при старении клетки [65–67]. Накапливаются доказательства, что процессы аутофагии чрезмерно поврежденных органелл, например, пероксисом, эндоплазматической сети и митохондрий, могут включаться в ответ на увеличение продукции АФК [68, 69]. Увеличение образования АФК в покоящейся митохондрии представляет угрозу для этой органеллы и, соответственно, для жизне-

способности клетки, поскольку это приводит к открытию каналов митохондриальной мембраны, сопровождается нарушением митохондриального мембранного потенциала и дальнейшим увеличением генерации электронтранспортной цепью АФК [33]. Эти события могут закончиться аутофагией, апоптозом или некрозом [70–72].

Воспаление представляет собой патофизиологический процесс, связанный с активацией нейтрофильных лейкоцитов. Нейтрофилы и моноциты активируются при действии медиаторов воспаления (цитокинов, хемоаттрактантов) и генерируют окислители с участием ферментов НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы. Сегментоядерные нейтрофилы являются наиболее многочисленными лейкоцитами крови и характеризуются высоким содержанием редокс-ферментов. НАДФН-оксидаза представляет собой мембрано-ассоциированный белковый комплекс, разобщенный в неактивированных клетках и собираемый при их активации [73]. НАДФН-оксидаза катализирует образование супероксидных анион-радикалов  $O_2^{\cdot-}$  внутри фагосом или у наружной поверхности клеток. Из  $O_2^{\cdot-}$  спонтанно или с участием фермента супероксиддисмутазы образуется  $H_2O_2$ . Миелопероксидаза относится к водорастворимым ферментам класса пероксидаз, катализирующим окисление различных субстратов в присутствии  $H_2O_2$ . При функционировании МПО также генерируется гипохлорит  $OCl^-$ . Компоненты НАДФН-оксидазы и МПО в неактивированных нейтрофилах депонированы в лизосомальных гранулах, поэтому процессу генерации АФК предшествуют процессы дегрануляции. Механизмы активации нейтрофилов и сборки систем генерации АФК могут включать активацию путей внутриклеточной передачи сигналов, зависящих от уровня свободных ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле, активации фосфолипаз C, D, A<sub>2</sub>, серин/треониновых и тирозинных протеинкиназ, липокси- и циклооксигеназ, гуанилат- и аденилатциклаз, образования инозитол-3-фосфата, диацилглицерола, фосфатидной кислоты, арахидоновой кислоты и др. [74, 75, 76]. Таким образом, для понимания причин патологических изменений и определения подходов к регуляции активности нейтрофилов, а также при их участии в воспалении необходимо исследование механизмов внутриклеточной передачи сигналов в этих клетках в норме и при заболеваниях [77–81].

На протяжении последних 20 лет интенсивно изучаются теоретические и практические аспекты действия «кластогенных факторов» (CFs), содержащих повреждающие хромосомы субстанции. Эти факторы играют патогенетическую роль при хронических воспалительных заболеваниях, опухолевой трансформации клеток и радиационных воздействиях [82–86]. Цитогенетические эффекты CFs связаны с окислительным стрессом. Известны четыре основных механизма формирования CFs. 1. Образование 4-гидроксиноненаля после актива-

ции фосфолипазы A2 и каскада превращений арахидоновой кислоты до эйкозаноидов супероксидным анион-радикалом. Гидроксипероксид вызывает повреждения ДНК путем ингибирования ДНК-полимераз и образования аддуктов с клеточными тиолами. 2. Супероксидный анион-радикал при респираторном взрыве активирует протеинкиназу C, что ведет к освобождению фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ). В свою очередь, ФНО- $\alpha$  усиливает процесс накопления супероксидного анион-радикала. 3. Хроническое воспаление сопряжено с активацией аденозиндезаминазы и ксантиноксидазы. Это ведет к накоплению инозиндифосфата (ИДФ) и инозинтрифосфата (ИТФ). Эти нуклеотиды в норме не образуются. Их появление поддерживает процесс накопления супероксидного анион-радикала. 4. ИТФ повышает внутриклеточную концентрацию ионов кальция с последующей активацией лизосомальных ферментов, в том числе и нуклеаз. Конкурентные отношения между ИТФ- и АТФ-связывающими сайтами ДНК-полимераз могут вести к повреждению ДНК. Таким образом, функционирует многофакторный и многоэтапный процесс взаимосвязи окислительного стресса с повреждением ДНК [87–89]. Применение антиоксидантных субстанций и антиоксидантных ферментов препятствует повреждению хромосом [90, 91].

#### 1.4 Антиоксидантная система

Антиоксидантная система выполняет защитную и регуляторную функции: инактивирует свободные радикалы, защищает организм от воздействия неблагоприятных факторов и является регулятором постоянства внутренней среды организма. Нарушение функции АОС сопровождается дисбалансом про/антиоксидантного гомеостаза, индукцией окислительного стресса и развитием необратимых патологических изменений в организме. В последние годы АОС изучается по трем основным направлениям: 1) оценка процессов ПОЛ и АОС в тканях при различных физиологических и патологических состояниях; 2) оценка антиоксидантных свойств биологически активных препаратов и лекарственных средств в эксперименте *in vivo* и в условиях *in vitro*, с использованием культур клеток, изолированных митохондрий, микросомальных мембран; 3) тестирование токсичности различных препаратов, биологически активных добавок, пищевых продуктов [15].

Учитывая, что митохондрии являются основными производителями АФК, рассмотрим митохондриальные системы антиоксидантной защиты. Митохондрии имеют многоуровневую систему ферментативной и неферментативной антиоксидантной защиты, обеспечивающей детоксикацию АФК, продуцируемых в описанных выше реакциях.

Ферментативные компоненты включают супероксиддисмутазу (КФ 1.15.1.11) [92], каталазу (КФ 1.11.1.6), пероксидазы (КФ 1.11.1.7): глутатионпероксидазу (ГП) (КФ 1.11.1.9) и фосфолипидгидропероксид глутатионпероксидазу (восстанавливает гидроперекиси фосфолипидов, липопротеинов и сложных эфиров холестерина) [93], а также ферменты, включаемые в восстановление окисленных форм малых антиоксидантных молекул, например, глутатионредуктазу (ГР) (КФ 1.6.4.2), ответственную за восстановление тиолов белков, и тиоредоксинредуктазу, или глутаредоксин редуктазу и пероксиредоксин (PRX) (КФ 1.11.1.15) [94–96].

Таким образом, генерация АФК в структурно и функционально интактной митохондрии уравнивается системой антиоксидантной защиты, ограничивая распространение и биодоступность АФК (рисунок 1.1).

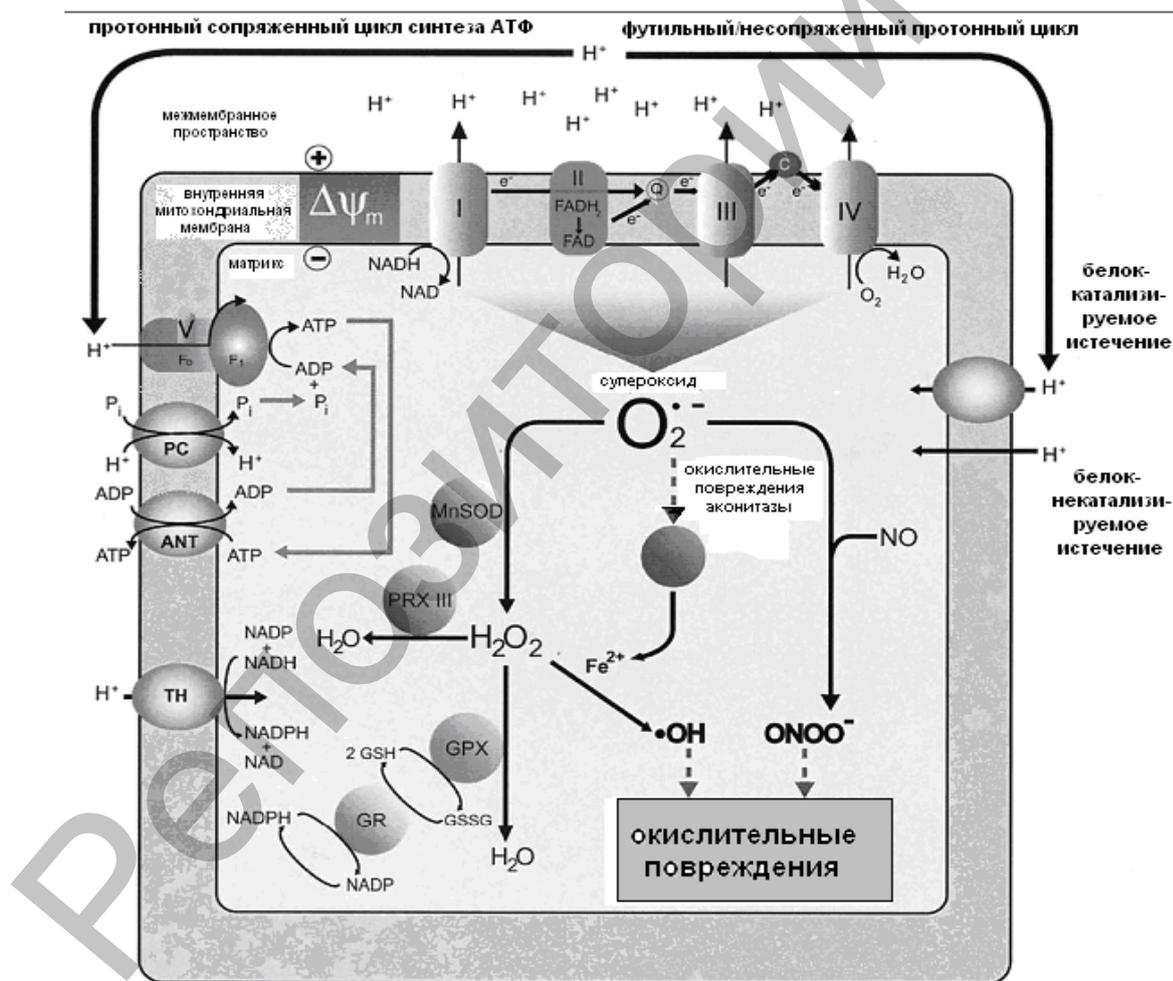


Рисунок 1.1 – Электронтранспортная цепь и митохондриальные окислительные повреждения [17]

Снижение антиоксидантной защиты в митохондриях является предпосылкой для увеличенной продукции АФК, развития окислительного стресса и последующей дисфункции митохондрий. Защиту против окислительного повреждения в митохондриальном матриксе обеспечивают Mn-SOD, глутатионпероксидаза и пероксиредоксин глутатионпероксидаза. Глутатионредуктаза в присутствии НАДФН осуществляет регенерацию окисленной формы глутатиона (GSSG) в восстановленную. Часть необходимого НАДФН поставляет трансгидрогеназа [102].

Антиоксиданты делятся на экзогенные (витамины, вторичные метаболиты растений антиоксидантного действия и др. восстановители) и эндогенные (глутатион, альфа-липоевая кислота, кофермент Q10, ферритин, мочевая кислота, билирубин, металлотioneины, L-карнитин и мелатонин) [103]. Исследования прооксидантно-антиоксидантных отношений получили развитие при анализе факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний [104]. Для этого изучали 1) окисленные липопротеины низкой плотности, F2 – изопростаны, 2) медиаторы окислительного стресса (например, окисление оксида азота, активность миелопероксидазы, концентрацию церулоплазмينا [105], 3) эндогенные белки-антиоксиданты, например, липопротеины высокой плотности, связанные параоксоназой, глутатион [106–108]. В последние годы пристальное внимание ученых привлекает семейство ферментов пероксиредоксинов, которые представляют собой широкораспространенную семью антиоксидантных ферментов. У млекопитающих ферменты этой группы контролируют уровень цитокин-индуцированных пероксидов, участвующих в передаче клеточных сигналов. Активность пероксиредоксинов регулируется их фосфорилированием, редокс-статусом и степенью олигомеризации. Группа пероксиредоксинов разделена на 3 класса в зависимости от количества остатков цистеина в активном центре фермента [109–111]. Характерная особенность каталитического механизма этой группы антиоксидантных ферментов – окисление тиоловой R-SH группы редокс-активного цистеина активного центра до R-SOH состояния пероксидным субстратом (например, липидной гидроперекисью) [112]. Пероксиредоксины играют регуляторную роль в активации фактора транскрипции ядерного фактора – kB [111] и предотвращают образование реактивных форм кислорода, индуцированного эпидермальным фактором роста или белком p53 [113]. Большинство пероксиредоксинов локализованы внутриклеточно, но пероксиредоксин-IV является единственным секреторным белком, определяемым внеклеточно [114]. Получены доказательства роли пероксиредоксинов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [115, 116]. На экспериментальных животных показано, что пероксиредоксины защищают бета-клетки поджелудочной железы от повреждения стрептозотоцином, а также участвуют в профилактике атеросклероза и воспаления [117–120].

## 1.5 Окислительный стресс и его последствия

Физические, химические, биологические, нервно-психические и экологические факторы, индуцирующие развитие окислительного стресса, способны вызывать регистрируемые цитологическими и цитохимическими методами изменения генетического аппарата различных клеток живых организмов [121]. Такие данные были получены при исследовании влияния на человека аэрозолей красок, содержащих ксилен, толуен и пигменты [122], компонентов сигаретного дыма и алкогольных напитков [123], действия ионизирующего излучения [124], пестицидов [125], формирования эндогенных кластогенов [90], действия противовоспалительных агентов, канцерогенов [126, 127] и др. В результате появилось новое направление исследований «От оксидативного повреждения ДНК к молекулярной эпидемиологии» [128–134].

Наилучший объект по простоте исполнения, доступности и экономической целесообразности для анализа механизмов развития окислительного стресса в эукариотических клетках – проращиваемые зерновки растений, которые в состоянии покоя имеют пониженную влажность (5–10%). Оптимальными условиями для прорастания зерновок являются насыщенность их водой (45–50%) и наличие атмосферного кислорода [135, 136]. Прорастание семян – это фактически модель окислительного стресса, поскольку в клетках происходит накопление АФК, которые нарушают процессы транскрипции и репликации, изменяют состав мембранных липидов [14, 137]. Состояние покоя является приспособительным признаком, присущим семенам растений. Жизнеспособность зерновок поддерживается за счет активности компонентов антиоксидантной системы [138–144].

Другой удобной и доступной биологической моделью для изучения проявлений окислительного стресса является *Allium*-тест. Этот тест нашел широкое применение, особенно в развивающихся странах, для оценки биологического действия экологических поллютантов [145–149], синтетических добавок к пище [150], ионизирующего излучения [151], биофармацевтических субстанций [152–154] и др. Актуальность и востребованность теста доказываются приведенными работами за последние 5 лет. Этот тест позволяет выявлять динамические процессы развития окислительного стресса, состояния антиоксидантной системы во взаимосвязи с цитогенетическими и биохимическими характеристиками изучаемых процессов.

Биохимические нарушения, возникающие при окислительном стрессе, могут быть предотвращены, если активировать процессы формирования АОС, включая экспрессию генов антиоксидантных ферментов. Еще в 1996 году исследователями из Института теорети-

ческой и экспериментальной биофизики (Пушино, Россия) было показано, что диета, содержащая витамины и микроэлементы, повышает устойчивость тканей мышц к действию факторов окислительного стресса за счет повышения уровня эндогенных антиоксидантов, в том числе и экспрессии гена белка теплового шока HSP-70 [155]. В последние годы появилось много сообщений о способности различных компонентов пищи усиливать экспрессию белков антиоксидантной системы: применение богатого аргинином белка из кокосовых орехов [156, 157], экстрактов кожуры цитрусовых [158], красного вина, содержащего ресвератрол [159], линолевой кислоты и витамина Е [160] и др. Показано, что гомогенат чеснока способен индуцировать повышение активности антиоксидантных ферментов СОД и ГП [161].

В ряде экспериментов была сделана попытка перед моделированием окислительного стресса индуцировать синтез антиоксидантных ферментов. Были получены положительные результаты от применения сублетальной дозы эндотоксина перед моделированием миокардиального реперфузионного окислительного стресса [162] или от введения N-ацетилцистеина и дефероксамина перед моделированием кокаиновой цитотоксичности [163]. На культуре кардиомиоцитов показано, что альфа-липоевая кислота способна предотвращать рост АФК при добавлении к клеткам системы генерации активных метаболитов кислорода ксантиноксидаза/ксантин [164]. Изменение соотношения перекиси водорода и оксида азота способно регулировать подвижность лейкоцитов и их адгезивные свойства [165]. Накопление пролина в трансгенных растениях ведет к усилению транскрипции генов антиоксидантных ферментов [166]. Маркерами хронического воздействия пестицидов могут быть уровни мочевой кислоты и активности параоксоназы-1 [167]. Экспрессия генов зависит от соотношения оксидантов и антиоксидантов [168]. Кроме того, следует учитывать также явление полиморфизма генов антиоксидантных ферментов [169, 170]. К настоящему времени накоплен обширный фактический материал об экспрессии генов эндогенных антиоксидантных систем низкими дозами радиации [171], длительными физическими нагрузками [172], компонентами сигаретного дыма [173], развитием сепсиса [174] и др. Показано, например, что подавление экспрессии мРНК пероксиредоксина 3, тиоредоксина 2, глутредоксина 1 и глутатион-S-трансферазы связано с оксидативным стрессом, вызывающим возрастные изменения овариальной функции [175].

Таким образом, для борьбы с негативными проявлениями окислительного стресса применяют экзогенные антиоксиданты, чаще растительного происхождения (витамины, фенольные соединения, биофлавоноиды и др.) и разрабатываются способы активного вовлечения эндогенных антиоксидантов, например, путем воздействия на экс-

прессию генов белков, образующих АОС [176–182]. До настоящего времени не решен вопрос о возможности использования комплекса эндогенных антиоксидантов одного организма в качестве агента, принимающего участие в формировании эндогенной АОС другого организма [183–185].

### 1.6 Эндогенные антиоксиданты и продукты гистолиза

Значимые результаты были достигнуты в научном обосновании антиоксидантной эффективности пептидотерапии, т.е. лечении с помощью пептидов, представляющих собой вещества полипептидной природы, содержащие от 2 до 50 аминокислотных остатков [1]. Начиная с 70-х годов XX века в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН под руководством члена-корреспондента РАМН профессора В.Х. Хавинсона разработан новый подход к поиску физиологически активных пептидов. На основе анализа аминокислотной последовательности комплексов полипептидов, экстрагированных из органов и тканей животных, созданы короткие пептиды, имеющие в своем составе от 2 до 4 аминокислот. Пептиды являются копиями «активных участков» наиболее значимых в своей группе полипептидов, содержащихся в животных экстрактах. Это позволило создать новый класс препаратов, получивших общее название «Цитогены». Поскольку цитогены в отличие от экстрактов (группа полипептидов) содержат один вид молекул (наиболее значимый короткий пептид), они рекомендуются для применения на начальных этапах пептидной терапии различных заболеваний, а также для проведения коротких курсов профилактики преждевременного старения [186].

Возникает закономерный вопрос о молекулярных механизмах действия пептидов. По всей видимости, пептиды действуют на уровне транскрипции. В одной из первых работ по выяснению такого механизма В.Х. Хавинсон показал, что секреция мелатонина у старых макак-резусов повышалась под действием синтетического пептида эпителина (ала-глу-асп-глу), который сконструирован на основании анализа аминокислот, содержащихся в комплексном пептидном препарате эпифиза эпителиамине. Эпителин вводили старым самкам (20–26 лет) в течение 10 суток. В результате вечерний уровень мелатонина, сниженный по сравнению с молодыми животными (6–8 лет) в 2 раза, повышался в 3 раза и оказывался выше, чем у молодых обезьян [187]. Было высказано предположение, что действие пептидов связано с регуляцией экспрессии генов, в частности, на уровне транскрипции [188–191]. В другой серии экспериментов исследовалось действие эпителина на плодовую мушку *Drosophila melanogaster*. Эпителин добавляли в питательную среду личинок. После этого взрослые особи,

содержавшиеся уже без эпителиона, в течение всей жизни имели сниженный уровень продуктов перекисного окисления липидов. Удельная активность каталазы у дрозофил 14-суточного возраста была выше после воздействия на личинок эпителионом [192, 193]. Возможно, что снижение интенсивности свободнорадикальных процессов в организме взрослых мушек, которые вывелись из получавших эпителион личинок, обуславливает увеличение продолжительности их жизни [194].

Хорошо известно, что в случае избыточного разрушения макромолекул через механизмы окислительного стресса (при действии ионизирующего излучения, солей тяжелых металлов (ТМ), повреждениях мембранных структур и др.) увеличивается концентрация их метаболитов, обладающих антиоксидантными свойствами (билирубин при распаде гемоглобина, аминокислоты и пептиды при распаде белков, мочевая кислота при распаде пуриновых нуклеотидов нуклеиновых кислот). Можно предположить наличие эволюционно закрепленного механизма защиты от патологических процессов (по крайней мере, на ранних стадиях их развития) путем первичного накопления эндогенных антиоксидантов при окислительной деградации биополимеров. Поскольку свободнорадикальные процессы сопряжены с функционированием других защитных систем организма, увеличение концентрации эндогенных антиоксидантов будет способствовать мембраностабилизирующему эффекту, связанному с механизмами иммунного ответа, репаративного синтеза ДНК, обезвреживания ксенобиотиков, поддержания реологических свойств крови и баланса продукции и трат энергии. Не исключено, что такой механизм может участвовать в разнообразных терапевтических эффектах при применении гидролизатов тканей живых организмов [195–199].

Все вышеизложенное показывает, что для совершенствования терапии, направленной на оптимизацию функционирования эндогенных антиоксидантов, существует двуединая проблема: точное осуществление необходимой глубины гидролиза макромолекул биологического материала и определение состава гидролизата с выделением основной действующей субстанции.

Для решения этой проблемы был осуществлен поиск биологического объекта, в котором в естественных условиях происходит гистоллиз с последующим использованием продуктов гидролитического распада макромолекул для создания новых тканей. Таким объектом явился дубовый шелкопряд (китайская дубовая павлиноглазка) (*Antheraea pernyi* G.-M.), включающий в жизненном цикле фазу куколки между личинкой (гусеница) и имаго (бабочкой). Куколка этого насекомого находится в состоянии диапаузы 7–8 месяцев. В этом периоде жидкое содержимое куколок, образованное в результате гистоллиза тканей гусеницы V возраста, устойчиво к окислительному стрессу.

су и бактериальной контаминации. Следовательно, в биотехнологии можно применять жидкое содержимое куколок как сырье для получения антиоксидантных, бактериостатических и иммуномодулирующих препаратов [200–204]. Это выгодно отличает жидкое содержимое куколок от продуктов, обогащенных пептидами и свободными аминокислотами, полученными путем гидролиза различных живых объектов, чаще гидробионтов. В результате гидролиза, нейтрализации и сушки последних создаются лечебно-профилактические продукты, обладающие антиоксидантным, иммуномодулирующим и регулирующим метаболизм действиями.

Таким образом, для формулирования цели и задач исследования следует учитывать: 1) открытие мощной антиоксидантной системы содержимого куколок дубового шелкопряда, полученного в результате гистолиза, 2) результаты предварительных экспериментов по влиянию жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда на клетки и ткани живых организмов и 3) перспективы использования продуктов гистолиза, содержащихся в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда, в медицине и биологии. Данное исследование соответствует основным направлениям научно-практических разработок отечественной биологической школы [205–210].

## ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор объектов исследования обусловлен необходимостью установления природы продуктов гистолиза, отвечающих за антиоксидантную активность. Это позволит применять их для предупреждения или уменьшения биохимических проявлений стресса на клеточном и тканевом уровнях других организмов. В работе использованы объекты исследования четырех уровней сложности:

1) нативная гемолимфа куколок дубового шелкопряда (ГКДШ), содержащая весь комплекс продуктов гистолиза;

2) экстракт куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ), полученный трехкратной экстракцией куколок кипящим 0,9% раствором NaCl и содержащий термостабильные низкомолекулярные вещества;

3) фракции гемолимфы, полученные методом гель-фильтрации на сефадексе G25 fine, в результате чего отделение полимерных молекул от мономерных происходит без термического воздействия;

4) созданные искусственные аминокислотные смеси на основе качественного и количественного состава аминокислот во фракциях гемолимфы.

Для нормирования объектов исследования использован их аминокислотный состав (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Концентрации свободных аминокислот (АК) и их производных в зависимости от способа выделения (ммоль/л, в пересчете на 1 л исходного материала)

Азотсодержащее соединение	Гемолимфа	Экстракт куколок	Фракции гемолимфы
Аспарагиновая кислота	4,70	4,97	0,82
Глутаминовая кислота	0,89	30,8	16,5
Серин	13,1	16,6	75
Глутамин	19,1	0,51	18,1
Гистидин	10,3	11,4	114
Глицин	17,2	10,8	61
Треонин	10,3	5,48	42,6
Цитруллин	2,15	0,68	7,2
Аргинин	–	6,03	55
Аланин	18,3	19,6	45,4
Таурин	1,00	0,65	1,56
Тирозин	2,53	6,63	1,60
Этаноламин	0,22	0,98	0,61
Валин	8,16	4,59	31,0

Окончание таблицы 2.1

Метионин	0,67	0,23	3,31
Цистатионин	–	4,39	65
Триптофан	–	0,84	0,82
Изолейцин	4,33	2,46	18,4
Фенилаланин	1,04	2,59	6,70
Лейцин	4,76	3,78	17,2
Гидроксипролин	0,04	4,44	0,55
Орнитин	–	12,9	7,2
Лизин	8,66	16,8	93
Пролин	5,58	28,0	34,5
Сумма, все АК	133	196,2	717,1
Сумма АК с антиоксидант-ным действием	57,0	117,2 × 2,05 раза	353,6 × 6,2 раза

Выявлено увеличение концентрации суммы всех аминокислот (в скобках – суммы аминокислот с антиоксидантным действием) в хлорнокислых экстрактах в последовательности: гемолимфа – 14,6 г/л (6,27 г/л) < экстракт куколок – 21,6 г/л (12,9 г/л) < фракции гемолимфы – 78,9 г/л (38,9 г/л). Спектр аминокислот гемолимфы оценивали катионообменной хроматографией одноколоночным методом на автоанализаторе аминокислот Т-339М (Чехия) по модифицированному методу J.V. Bensen, J.A. Paterson (1974). Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот экстракта куколок и фракций гемолимфы проводилась обращенно-фазовой хроматографией с помощью хроматографической системы «Agilent 1100, 1200». В таблице 2.2 представлены методы анализа объектов исследования.

Таблица 2.2 – Общая характеристика анализа объектов исследования

№ п/п	Компоненты анализа	Исследуемые показатели	Количество
<b>Гемолимфа</b>			
1.	Гемолимфа куколок дубового шелкопряда	Окраска культивируемых клеток гемолимфы 1–6 с Hoechst-33342 и йодистым пропидием	3 анализа
2.	Гемолимфа куколок дубового шелкопряда	Динамика биохимических показателей гемолимфы (сентябрь, ноябрь, январь, февраль, март): глюкоза, триглицериды, холестерол, холестерол липопротеинов высокой плотности, мочевиная кислота, калий, амилаза, $\gamma$ -глутамилтрансфераза, аспаратаминотрансфераза, аланин-аминотрансфераза	25 куколок, 250 анализов

Продолжение таблицы 2.2

3.	ГКДШ и гемолимфа виноградных улиток (ГВУ)	Витамины В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub> , С, А, Е, пировиноградная кислота, 4-пиридоксильная кислота	7 куколок, 7 виноградных улиток, 49 анализов
4.	Личинки и куколки	Белки тканей и гемолимфы	42 личинки и 28 куколок, 70 анализов
5.	Гемолимфа куколок дубового шелкопряда	Гель-фильтрация на сефадексе G25 fine: спектрофотометрия при 210 нм, 260 нм, 280 нм, определение содержания белка, SH-групп, глутатиона, мочевой кислоты, фенольных соединений	56 фракций, 300 анализов
6.	ГКДШ	Содержание аминокислот в хлорнокислых экстрактах	3 анализа
7.	Гемолимфа куколок и личинок дубового шелкопряда	Ингибирование реакции Фентона	21 анализ
8.	ГКДШ	Ингибирование люминолопосредованной хемилюминесценции	186 анализов
9.	Водные экстракты 25 растений и расплод пчел	Ингибирование люминолопосредованной хемилюминесценции	85 анализов
10.	Гемолимфа куколок дубового шелкопряда	Ингибирование действия tBOOH на мембраны эритроцитов: ТБКРС, глутатион	120 анализов
<b>Фракции гемолимфы</b>			
1.	Фракции 17–32	Содержание аминокислот	30 анализов
2.	Фракции 17–32	Влияние на количество делений мезенхимальных стволовых клеток (МСК)	30 анализов
3.	Фракции 1–56	Культивирование клеток Нер G2: МТТ-тест, включение меченого тимидина в ДНК	318 анализов
4.	Фракции 1–56	Антиоксидантная активность: люминолзависимая хемилюминесценция	318 анализов
<b>Экстракт куколок дубового шелкопряда</b>			
1.	ЭКДШ	Содержание свободных аминокислот в хлорнокислых экстрактах	7 анализов
2.	ЭКДШ	Действие на содержание серосодержащих аминокислот в лимфоцитах тканей растущих крыс	14 крыс, 28 анализов
3.	ЭКДШ	Стресс прорастания: длина корней, активность глутатионредуктазы, каталазы, ТБКРС, диеновые конъюгаты, α-аминоазот, фотосинтетические пигменты	728 анализов
4.	ЭКДШ	Температурный стресс: ТБКРС, активность каталазы	280 анализов

5.	ЭКДШ	Химический стресс: длина корней, ТБКРС, диеновые конъюгаты, сумма фенольных соединений, $\alpha$ -аминоазот, фотосинтетические пигменты, активность глутатионредуктазы, каталазы, супероксиддисмутазы	980 анализов
6.	ЭКДШ	Экспрессия генов $\beta$ -глюкозидазы (Gluc), фосфолипаза D (D-PL), фитохрома A (PhyA)	12 анализов
<b>Искусственные аминокислотные смеси</b>			
1.	Аминокислотный состав фракций 15–30	Обоснование выбора состава искусственных аминокислотных смесей: длина корней, ТБКРС, активность глутатионредуктазы, каталазы	476 анализов
2.	Искусственные аминокислотные смеси (5)	Действие при прорастании семян: длина корней, ТБКРС, активность глутатионредуктазы, каталазы	140 анализов
<b>Итого:</b>			<b>4434 анализа</b>

## 2.1 Методы получения и исследования химического состава продуктов гистолиза

### 2.1.1 Получение гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда

100 г куколок дубового шелкопряда измельчали и заливали 500 мл изотонического раствора (0,9% NaCl). Затем смесь нагревали до кипения, сливали полученный экстракт, а в оставшуюся биомассу доливали 300 мл 0,9% NaCl, кипятили, сливали экстракт. В оставшуюся биомассу добавляли еще 200 мл 0,9% NaCl, кипятили, экстракт сливали и объединяли с двумя предыдущими. Смесь экстрактов фильтровали, выдерживали в течение 48 часов при 5°C, после чего снова фильтровали для полного удаления осадка. После этого стандартизировали раствор по концентрации в нем основной фармакологически активной субстанции (суммы свободных аминокислот) способом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и доводили 0,9% NaCl до объема, содержащего не более 110 мг/л альфа-аминоазота или 850 мг/л суммы свободных аминокислот. Полученный таким образом экстракт разливали по флаконам и стерилизовали [патент Республики Беларусь № 15645].

### 2.1.2 Методика разделения гемолимфы на фракции

Для получения гемолимфы куколку анестезировали выдерживанием кокона на льду. Скальпелем срезали каудальный конец ( $\approx$  5 мм) и собирали вытекающую гемолимфу в стерильную пробирку эппен-

дорф. Для разделения гемолимфы куколок дубового шелкопряда использовали колонку диаметром 2,5 см и объемом 130 мл, заполненную Sephadex G25 fine, уравновешенную 0,01 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Предварительно сефадекс с достаточным количеством воды кипятили в течение 30 мин, затем отмучивали для удаления мелких частиц.

Содержимое куколок шелкопряда 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. Затем 2,5 мл надосадочной жидкости пропускали через хроматографическую колонку, заполненную сефадексом. Использовали для элюции 0,01 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Собирали фракции объемом 3 мл со скоростью 3 мин/фракция. Анализ элюатов (пробирки 1–53) проводили путем спектрофотометрии при 210, 260 и 280 нм. Ориентировочно рассчитывали концентрацию во фракциях белков (пептидов) по формуле  $1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} = \text{мг белка в мл пробы}$  (A – экстинкция при данной длине волны).

### **2.1.3 Способы определения содержания аминокислот**

Содержание свободных аминокислот в гемолимфе куколок шелкопряда анализировали методом катионообменной хроматографии в модификации J.V. Bensen, J.A. Paterson [211] на автоматическом анализаторе аминокислот Т-339М (Чехия). Применявшийся метод определения свободных аминокислот и их дериватов основан на одноколоночном разделении с детектированием по поглощению при постоянной длине волны. Принцип метода заключается в элюировании аминокислот и родственных им соединений с катионообменника ступенчатым градиентом Li-цитратных буферных растворов. Пробы депротеинизировали добавлением равных объемов 1 М раствора хлорной кислоты, содержащей внутренний стандарт (0,2 мМ  $\delta$ -аминовалериановой кислоты (dAVA), а также 50 мг/л ЭДТА и 50 мг/л  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  в качестве антиоксиданта), после чего центрифугировали на холоду 15 мин при 16000 g. Супернатант немедленно отделяли от осадка. Пробы хранили при  $-18^\circ\text{C}$  до анализа не более 14 суток, после размораживания повторно центрифугировали. Растворы стандартов, используемые для отработки разделения и калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом. После введения кислотного безбелкового экстракта гемолимфы куколок дубового шелкопряда на аналитическую колонку (22×0,35 см), заполненную сферическим катионообменником LGAN 2B

(размер частиц 8 мкм) («Lachema», Чехия), хроматографическое разделение последовательно осуществлялось Li-цитратными буферами со скоростью потока элюента 14 мл/ч. Температура колонки в середине анализа (58 мин) повышалась с 38,4 до 60°C. Количественное содержание каждого компонента спектра свободных аминокислот оценивалось по поглощению при 520 нм после постколоночной реакции элюата с 1%-ным раствором нингидрина в капиллярном реакторе, помещенном в кипящую водяную баню. Сигнал фотометра регистрировался аналого-цифровым преобразованием программно-аппаратного комплекса «Мультихром-1», с помощью которого происходили регистрация хроматограмм, их обработка, идентификация пиков и вычисление концентраций по площадям пиков.

Количественную и качественную идентификацию свободных аминокислот и их дериватов во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда и в экстракте куколок дубового шелкопряда проводили обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией в последовательности: 1) предколоночная дериватизация аминокислот, содержащих первичную аминогруппу, 0,4% о-фталевым альдегидом и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислотой в 0,4 М Na-боратном буфере, рН 9,4 (дериватирующий раствор смешивали с пробой в соотношении 6:1); 2) последующая дериватизация аминокислот с вторичным атомом азота (пролина и оксипролина) 9-флуоренилметилкарбомоилхлоридом, раствор которого в ацетонитриле 7 мг/мл добавляли в объеме 1,5 исходного объема хлорнокислого экстракта; 3) нейтрализация пробы добавлением 0,2 М раствора хлорной кислоты до нейтрального или слабокислого значения рН и немедленное введение ее в хроматограф. Вся процедура дериватизации осуществлялась автоматически с помощью автосамплера Agilent 1200, который термостатировали при 5°C. Идентификация и количественная оценка полученных значений производились программой Agilent Chem Station V.04.02 путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот. Последняя содержала равные количества определяемых соединений по 500 нмоль/мл каждого и обрабатывалась так же, как соответствующие пробы. Использовали концентрат стандартной смеси физиологических аминокислот (кислых, нейтральных и основных) фирмы «Aldrich» (США), в которую дополнительно вносили компоненты, представляющие интерес и не содержащиеся в данной смеси (цистеиновую кислоту, L-глутамин, L-аспарагин, O-фосфоэтаноламин) в тех же концентрациях. В работе применяли колонку Zorbax XDB C<sub>8</sub>, 3,5 мкм, 3×150 мм; скорость потока была 0,2 мл/мин, температура колонки – 37°C. Подвижная фаза А: 0,1 М Na-ацетатный буфер (рН 6,85), содержащий 20 мг/л ЭДТА;

подвижная фаза В: ацетонитрил/вода 7/3 (об./об.). Разделение проводили с градиентным элюированием от 5 до 100% В за 78 мин. При выполнении исследований аминокислотного состава биологических объектов консультативную и методическую помощь оказывал кандидат биологических наук Е.М. Дорошенко, при этом использовалось оборудование ЦНИЛ Гродненского государственного медицинского университета.

#### ***2.1.4 Методы определения показателей гемолимфы куколок на протяжении диапаузы***

**Содержание белка** определяли по Лоури [212]. Количество белка в пробе устанавливали по данным оптической плотности с помощью калибровочного графика, построенного по стандартному раствору бычьего сывороточного альбумина.

Исследования биохимического состава проведены ферментативными **тест-системами сухой химии** с помощью диагностических полосок «Роше-диагностика» и анализатора «Рефлотрон IV». Для этого свежесобранную гемолимфу куколок (32 мкл) помещали на тест-полоску и осуществляли анализ методом рефлометрии.

**Содержание витаминов** в гемолимфе определяли общепринятыми флуоресцентными и спектрофотометрическими методами [213].

#### ***2.1.5 Определение жизнеспособности клеток жирового тела и гемолимфы***

Для культивирования клеток жирового тела (ЖТ) использовали модифицированные Дульбекко среды Игла (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM) с различными добавками. Применяли 5 вариантов сред инкубации для поддержания роста клеток. В работе использовали гемолимфу куколок, разведенную 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:3. Для получения клеток жирового тела хитиновый покров куколки разрезали продольно, извлекали жировое тело, измельчали ножницами и инкубировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с коллагеназой (0,075%) при 37°C 1 час. Клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали ФСБ и переводили в питательную среду. Полученные клетки ( $3,2 \cdot 10^7$  клеток жирового тела или  $2 \cdot 10^5$  клеток гемолимфы) высевали в чашки Петри (21 см<sup>2</sup>) в 4 мл среды и инкубировали во влажном эксикаторе при 27°C. По истечении 1 суток проводили смену среды для удаления неприкрепившихся клеток. Затем проводили окраску ядер: клетки инкубировали 15 минут в ФСБ с добавкой флуоресцентного красителя Hoechst-33342 ( $10^{-5}$  М) или красителей Hoechst-33342 и йодистый пропидий (по  $10^{-5}$  М). Жизнеспособность оценивали с помощью МТТ-теста. Исследования подраздела 2.1.5 монографии выполнялись совместно с кандидатом биологических наук М.М. Зафранской на базе ЦНИЛ БелМАПО.

## 2.2 Методы исследования биологической активности на клеточных культурах

### 2.2.1 Генерация нейтрофилами активных форм кислорода

Для получения нейтрофилов консервированную с 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 центрифужные пробирки наливали по 3 мл фиколл-урографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ), не касаясь стенок пробирок, затем осторожно наслаивали по 9 мл плазмы с лейкоцитами и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 оборотов/мин для разделения лейкоцитов по плотности. После центрифугирования надосадочную жидкость и слой мононуклеаров удаляли, а к осадку, содержащему фракцию гранулоцитов, добавляли 1 мл ледяной дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$ , перемешивали в течение 20 секунд для гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов, после чего восстанавливали осмотичность раствора добавлением 1 мл 0,3 моль/л NaCl. Затем клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л NaCl в течение 8–10 минут. При этом внеклеточные белки, полимеры и малые молекулы остались в надосадочной жидкости, а гранулоциты осели на дно. Полученную фракцию клеток ресуспендировали в сбалансированном буферном солевом растворе (СБСР) Эрла при pH 7,3. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96%. Для определения количества клеток в суспензии использовали камеру Горяева и световой микроскоп.

Суспензию нейтрофилов ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) помещали в стеклянную кювету, добавляли гемолимфу куколок дубового шелкопряда, люминол ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и исследовали параметры усиленной люминолом хемилюминесценции, обусловленной генерацией нейтрофилами АФК при активации клеток в процессе адгезии к стеклу. Через 10 минут в образцы вносили хемотаксический трипептид формил-метионил-лейцил-фенилаланин (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 АФК при действии fMLP и фагоцитозе клетками латекса. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ активированных клеток регистрировали с помощью компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биолюминометр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, Республика Беларусь) 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 лактекса или fMLP. Ингибиторный эффект выражали в процентах.

Для **оценки антиоксидантного действия** были использованы следующие системы, моделирующие образование свободных радикалов и активных кислородных метаболитов в организме, и методы регистрации:

- реакция Фентона (взаимодействие  $\text{FeSO}_4$  с  $\text{H}_2\text{O}_2$  и образование  $\text{HO}^\bullet$ ), метод ХЛ;
- окисление люминола пероксидазой хрена (ПХ) в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , метод ХЛ;
- образование дитирозина в системе «тирозин +  $\text{H}_2\text{O}_2$  + МПО нейтрофилов», флуоресцентный метод;
- генерация АКМ нейтрофилами крови человека при адгезии и фагоцитозе, Люм-ХЛ;
- галогенирование люминола при действии  $\text{OCl}^-$ , Люм-ХЛ.

### 2.2.2 Определение активности миелопероксидазы

Для изучения влияния гемолимфы куколок дубового шелкопряда на реакции окисления, катализируемые миелопероксидазой, нейтрофилы ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) разрушали добавлением 0,1% раствора Triton X-100. При этом МПО переходила в среду и становилась доступной для реакций, что позволяло исследовать влияние гемолимфы на реакции, катализируемые миелопероксидазой. В кювету хемилюминометра помещали суспензию разрушенных нейтрофилов, гемолимфу, люминол ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и оценивали скорость окисления люминола пероксидом водорода, катализируемую миелопероксидазой, хемилюминесцентным методом. Для этого регистрировали кинетические зависимости интенсивности хемилюминесценции, а затем рассчитывали интегральную интенсивность ХЛ за 1,5 мин. Ингибиторный эффект определяли в процентах.

Для оценки секреторной дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов суспензию клеток ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли гемолимфу, fMLP ( $7,5 \cdot 10^{-7}$  моль/л) и инкубировали в течение 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Нейтрофилы при адгезии на стекло и действии fMLP реактивируются и секретируют МПО во внеклеточную среду. По окончании инкубирования надосадочную жидкость собирали и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g для осаждения неадгезированных 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л). Значения выражали в процентах от общего уровня активности МПО в нейтрофилах.

### **2.2.3 Определение цитотоксичности гемолимфы и препаратов на ее основе**

Цитотоксичность препаратов в отношении нейтрофилов определяли по высвобождению лактатдегидрогеназы в среду инкубации с использованием спектрофотометрической методики. Нейтрофилы ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли гемолимфу и инкубировали в течение 60 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 оборотов/мин, надосадочную жидкость собирали. В образцах внеклеточной жидкости определяли активность лактатдегидрогеназы с помощью наборов и спектрофотометра PV 1251С («СОЛАР», Республика Беларусь) кинетическим методом, который основан на ферментативной реакции взаимодействия пирувата и НАДН с образованием лактата и  $\text{НАД}^+$ . Уменьшение концентрации НАДН в образцах за 1 мин, детектируемое по изменению оптической плотности образцов на длине волны 340 нм ( $\Delta D$ ), пропорционально активности ЛДГ (А):  $A = \Delta D \cdot 8600 \text{ [мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}]$ . 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 процентах ( $A_{\text{отн}}$ ) определяли по формуле:  $A_{\text{отн}} = A \cdot 100\% / A_0$ . Исследования подразделов 2.2.1 и 2.2.3 производились на базе кафедры биофизики БГУ совместно с кандидатом биологических наук Е.И. Коваленко.

### **2.2.4 Влияние фракций гемолимфы на культивирование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс**

Для получения мезенхимальных стволовых клеток в стерильных условиях производили забор жировой ткани крысы (ЖТК) из внутрибрюшинного пространства. После промывания стерильным раствором Хенкса жировую ткань инкубировали в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа в ФСБ. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС). Полученные в результате обработки коллагеназой клетки отмывали 2 раза центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде и высевали в концентрации  $5 \cdot 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$  в чашки диаметром 60 мм. Через 24 часа проводили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. По достижении 75% конfluenceности клетки снимали с поверхности культурального пластика с помощью 0,25% раствора трипсина/ЭДТА, затем трипсин ингибировали добавлением ФСБ, содержащего 10% ЭТС; после двукратного отмывания центрифугированием клетки засевали в культуральные чашки в концентрации  $1 \cdot 10^4$  клеток на  $\text{см}^2$  для получения первого пассажа. Через 24 часа

осуществляли смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смену среды проводили каждые четвертые сутки.

Использовали окраску CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester): мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани крысы, полученные трипсинизацией 3-го пассажа при конфлюэнтности  $\approx 75\%$ , ресуспендировали до концентрации  $10^6$  клеток/мл в ФСБ с добавкой 10% ЭТС и 7 мМ CFSE. CFSE – это вещество, представляющее собой флуоресцентную метку, способную проникать в клетку, сохраняться в ней в процессе развития, передаваться дочерним клеткам. Инкубировали 10 минут ( $37^\circ\text{C}$ , атмосфера 5%  $\text{CO}_2$ , влажность 99%) и дважды отмывали в ФСБ с добавкой 5% ЭТС. Посев и инкубацию осуществляли следующим образом: окрашенные МСК разводили до концентрации  $10^4$  клеток/мл в среде DMEM (Sigma) с содержанием глюкозы 1 г/л с добавками 10% ЭТС, 1% глутамин и 1% антибиотика (Sigma). Суспензию клеток разливали по 1 мл в лунки 24-луночного планшета ( $\approx 10^4$  клеток в лунку, или  $\approx 5 \cdot 10^3$  клеток/ $\text{cm}^2$ ). В опытные лунки добавляли по 10 или 100 мкл фракций гемолимфы (получали разведения гемолимфы 1:100 и 1:10, соответственно), в контрольные – по 10 или 100 мкл дистиллированной воды и перемешивали. Инкубировали 5 дней ( $37^\circ\text{C}$ , атмосфера 5%  $\text{CO}_2$ ). Использовали фракции гемолимфы, полученные методом гель-хроматографии на сефадексе G25 fine, содержащие пептиды (фракции 10–29).

Регистрация результатов проводилась на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500. Исследования подраздела 2.2.4 монографии выполнялись совместно с кандидатом биологических наук М.М. Зафранской на базе ЦНИЛ БелМАПО.

### **2.2.5 Оценка цитотоксичности фракций гемолимфы с использованием культур клеток Нер G2**

Материал фракций гемолимфы куколок шелкопряда использовали для определения цитотоксической активности в опытах *in vitro* в культуре клеток. Клетки Нер G2 (гепатокарцинома) получали из American Type Culture Collection (США). Культивирование клеток проводили во влажной атмосфере (5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ). Использовали среды DMEM и RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), а также термоинактивированные эмбриональную телячью сыворотку и лошадиную сыворотку фирмы «Gibco» США. Среда инкубации содержала 10% ЭТС, а также 2 мМ глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин – 10 ед/мл и 10 мкг/мл, соответственно (фирма «Панэко»).

Для определения цитотоксической активности фракций гемолимфы клетки пассировали (100 мкл/лунку) в 96-луночные планшеты с плотностью  $2,5 \times 10^3$  клеток/лунку. Клетки преинкубировали в план-

шетах (Costar) в течение 24 часов для их адаптации перед добавлением фракций гемолимфы. Все эксперименты по культивированию клеток проводили в 4-х повторностях. В лунки помещали по 15 мкл фракций гемолимфы. Инкубацию проводили 48 или 72 часа, после чего оценивали цитотоксичность с помощью МТТ-теста.

**Определение цитотоксичности с помощью МТТ-теста.** Реактив МТТ (ДиаЭм, Германия) представляет собой тиазолий синий тетразолий бромид (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-3,5-дифенилформазан). Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий только метаболически активных клеток конвертируют МТТ в окрашенные кристаллы формазана. Для проведения МТТ-теста к культивируемым клеткам добавляли 10 мкл 0,5%-го раствора МТТ. Затем клетки культивировали еще 3 часа при 37°C. После удаления культуральной среды кристаллы формазана растворяли в 0,1 мл DMSO (Dimethyl sulfoxide) при встряхивании на Titramax 101 в течение 10 мин. Суспензию клеток переносили в 96-луночные планшеты с коническим дном и осаждали в центрифуге Eppendorf 5810 R при 1000 g 5 мин. Супернатанты удаляли, а осадки растворяли в 0,1 мл DMSO при встряхивании планшетов в течение 10 мин. Затем окрашенные растворы переносили согласно номерам проб в 96-луночные планшеты с плоским дном и измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 540 нм.

Количество выживших клеток рассчитывали в процентах от контроля, которым являются клетки, культивированные без добавления фракций гемолимфы.

Для анализа **интенсивности синтеза ДНК** в клетках исследуемую клеточную линию культивировали в двух 96-луночных планшетах с одинаковой схемой эксперимента: в одном определяли цитотоксичность фракции гемолимфы с использованием МТТ-теста, который начинали ставить за 3 часа до окончания эксперимента, а в другом – скорость синтеза ДНК. К клеткам в последнем случае добавляли за 5 часов до окончания эксперимента 1 мкCi/лунку [<sup>14</sup>C]-тимидина (Чехия, активность 56 mCi/mmol, соответственно). Из лунок клеток в монослойной культуре в конце эксперимента тщательно убирали ростовую среду, промывали 2 раза ледяной средой Хенкса. Для удаления радиоактивности кислоторастворимого пула из клеток добавляли 0,1 мл фиксирующего раствора спирт:уксусная кислота в соотношении 9:1 и оставляли на ночь при -10°C. После удаления супернатанта осадок промывали ледяной средой Хенкса, к нему добавляли 50 мкл 0,3 N KOH и помещали на 10–12 часов в термостат при 37°C. Гидролизат нейтрализовали до pH 7,0 1,0 N раствором хлорной кислоты и его радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Tri Carb 2800 (Перкин Эльмер, США) в жидкости Брея.

Результаты рассчитывали в имп/мин на  $10^6$  клеток и в единицах по отношению к контролю, принятому за единицу. Число клеток определяли в МТТ-тесте. Если требовалось в клетках одной и той же лунки установить и цитотоксичность фракций гемолимфы, и влияние их на включение радиоактивной метки в ДНК, то использовали метод окраски клеток кристаллвиолетом (метилвиолет 10В). Эту краску применяли, когда была уверенность, что гибели клеток нет. После промывки лунок раствором Хенкса в них добавляли по 50 мкл 0,2% в 2% этаноле краски, трижды промывали водой, элюировали краску 10% раствором уксусной кислоты и оценивали экстинкции. Исследования подраздела 2.2.5 монографии выполнялись на базе лаборатории медицинской биотехнологии ГУ НИИ биомедхимии РАМН имени В.Н. Ореховича (г. Москва) совместно с доктором биологических наук О.Ю. Абакумовой.

### **2.3 Методы биохимических исследований биологической активности продуктов гистолиза на тканевом уровне**

Методы культивирования животных тканей являются длительными, дорогими, сложными и требуют специального оборудования. При культивировании тканей животных трудно найти простой макроскопический параметр, который мог бы достаточно объективно отображать изменения на уровне метаболизма клеток. Этих недостатков лишены простейшие растительные тест-объекты, с помощью которых можно в короткие сроки оценить макроскопический параметр (например, длину корней, листьев) в сравнении с биохимическими показателями. Такие тест-объекты широко применяются при моделировании окислительного стресса и оценке действия антиоксидантных систем. Животные и растительные ткани объединяет то, что они построены из эукариотических клеток.

#### ***2.3.1 Получение лимфоцитов из тканей растущих крыс***

Крысам линии Вистар массой 60–70 г, получавшим полноценный рацион вивария, ежедневно внутрижелудочно вводили экстракт куколок дубового шелкопряда в разведении 1:10 в течение 10 дней. Контрольные животные получали аналогичный объем физиологического раствора. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Выделяли селезенку, тимус и печень. Ткани печени, селезенки и тимуса измельчали ножницами, тщательно растирали в тефлоновом гомогенизаторе. В пробирку с кусочками ткани добавляли приблизительно 1 мл питательной среды, содержащей коллагеназу (1–8 мг/мл), и, закрыв пробкой, инкубировали при 37°C в течение 30 мин. В градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,077 г/см<sup>3</sup>) выделяли лимфоциты.

Определение свободных аминокислот проводили в хлорнокислых экстрактах диализатов лимфоцитов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм).

### **2.3.2 Проращивание растительных тест-объектов в лабораторных условиях**

**Лук.** Луковицы *Allium cepa* L. сорта «Штуттгартен ризен», диаметром 2,0–2,5 см, для активизации и синхронизации процесса прорастания выдерживали при 4°C в течение 14 дней. По истечении этого времени у них удаляли внешние чешуи и коричневую нижнюю пластинку, затем помещали в пробирки (объемом 20 мл) с дистиллированной водой. Проращивание луковиц проводили при комнатной температуре и естественном освещении. Через 48 часов луковицы помещали на 24 часа в тестируемые растворы (экстракт куколок шелкопряда, регуляторы роста, соли тяжелых металлов). В качестве контроля применяли дистиллированную воду. Для биохимических анализов использовали листья растений на 12-е сутки (9-е сутки после действия тестируемых растворов).

**Ячмень.** Для получения этиолированных проростков зерновки ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Гонар» тщательно промывали дистиллированной водой и оставляли на 24 часа для набухания в исследуемых растворах и дистиллированной воде (контроль). Затем семена раскладывали на фильтровальную бумагу, сворачивали в рулоны, которые помещали в стаканы с дистиллированной водой, и проращивали в термостате при 23°C.

При моделировании *гипотермии* растения ячменя в возрасте 5 суток помещали на 24 часа в камеру с температурой 4–6°C, затем на сутки растения возвращали в исходные температурные условия.

Для моделирования *гипертермии* растения ячменя в возрасте 6 суток помещали на 3 часа в термостат при 40°C, затем на сутки растения возвращали в оптимальные температурные условия.

Для биохимического анализа использовали проростки в возрасте семи суток, считая от закладки семян на проращивание. К этому моменту растения ячменя находились в фазе полностью развернутого первого листа, начала появления второго.

**Овес.** Растения овса (*Avena sativa* L.) сорта «Гоша» выращивали при 15-часовом световом дне и освещении полихроматичным белым светом (40 Вт, 150 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>), при температуре 25°C. Семена овса замачивали на сутки в воде (контроль) или в растворе экстракта куколок шелкопряда. Равномерно проклюнувшиеся зерновки отбирали для дальнейшего выращивания на воде или на тестируемом растворе, со-

ответственно. В возрасте проростков 3 и 7 суток со дня проклевывания проводили забор ткани из апикальной зоны листа проростка.

### **2.3.3 Определение биохимических показателей растительных тест-объектов**

Количественное определение **продуктов перекисного окисления липидов** проводили в листьях с применением теста с 2-тиобарбитуровой кислотой [214]. Концентрацию ТБКРС рассчитывали с использованием молярного коэффициента экстинкции  $1,56 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> и выражали в мкмоль/г.

Определение **диеновых конъюгатов** проводили с использованием смеси гептана и изопропилового спирта (1:1). Содержание рассчитывали по методу Стальной с учетом коэффициента молярной экстинкции –  $2,2 \cdot 10^5$  см<sup>-1</sup>·М<sup>-1</sup> [215].

**Активность каталазы** определяли по методу Королюк, основанному на определении количества H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не разложившегося после инкубации с каталазой, путем спектрофотометрической регистрации окрашенного продукта реакции взаимодействия пероксида водорода с молибдатом аммония [216]. Активность каталазы рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции –  $22200$  см<sup>-1</sup>·М<sup>-1</sup> и выражали в мкмоль/мин·г ткани.

Активность глутатионредуктазы определяли по [217]. Принцип определения **активности ГР** заключается в превращении GSSG в GSH в присутствии НАДФН. Активность глутатионредуктазы рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции –  $6,22$  мМ<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> и выражали в мкмоль/мин·г ткани.

Активность **СОД** определяли с использованием системы, обеспечивающей восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) [218], рассчитывали с учетом процента ингибирования реакции и выражали в ммоль/мин·г ткани.

Определение суммы **фенольных соединений и флавоноидов** проводили в спиртовых экстрактах [219]. Рассчитывали сумму фенолов и сумму флавоноидов с учетом удельных показателей поглощения (для фенолов галловой кислоты в комплексе с реактивом Фолина–Чиокальто равным 90; для флавоноидов – гликозидов кверцетина в комплексе с хлоридом алюминия в этаноле равным 330) и выражали в процентах.

Количество **α-аминного азота** устанавливали нингидриновым способом [220] и рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору глицина. Содержание свободных аминокислот выражали в мг/г сырого или сухого материала.

Экстракцию **фотосинтетических пигментов** проводили безводным ацетоном. Количество хлорофиллов и каротиноидов определяли

спектрофотометрически при 440, 644, 662 и 700 нм по методу Шлыка [221].

#### 2.3.4 Молекулярно-генетические методы исследования растительных тканей

Уровень относительной экспрессии (R) генов:  $\beta$ -глюкозидазы, фосфолипазы, фитохрома A – измеряли в ткани из апикальной зоны листа 3-х и 7-ми суточных проростков.

Выделение общей РНК из растительной ткани проводили с использованием реагента *TRISOL* в соответствии с коммерческим протоколом *Invitrogen* (USA). Количество выделенной РНК определялось спектрофотометрически по поглощению при 260 нм. Степень чистоты препаратов оценивалась по соотношению  $A_{260}/A_{280}$  ( $A_{260}/A_{280} = 2,0$ ).

Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции (ОТ) с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (*M-MLN* – *Moloney murine leukemia virus*). Реакцию проводили с помощью набора реагентов «*RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*» в соответствии со стандартным протоколом (*Fermentas*). В качестве затравки для синтеза цепи ДНК на РНК-матрице использовали смесь случайных гексамерных праймеров (*random hexanucleotide primers*). На реакцию брали 2 мкг общей РНК, предварительно обработанной ДНКазой (Деохугибонуклеаза I), что позволяло избавиться от загрязнения препарата геномной ДНК. Реакцию проводили в соответствии со стандартным протоколом (*Fermentas*).

Объем реакционной смеси для амплификации фрагментов кДНК составлял 20 мкл. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реагентов «High Fidelity PCR Enzyme Mix». Реакционная смесь содержала 200 мкМ дНТФ, 1 U *Taq*-полимеразы, 100 нг кДНК. Использовали ген-специфические праймеры для ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Концентрации ионов магния и праймеров оптимизировались в ходе экспериментов. ПЦР проводили на амплификаторе MiniOpticon (Bio-Rad) в следующем режиме: начальная денатурация – 95°C, 3 мин; затем 40 циклов (денатурация – 95°C, 40 с; отжиг – 56°C, 30 с; элонгация – 72°C, 30 с); конечная элонгация – 72°C, 15 мин; остановка реакции – 10 мин, 10°C.

Анализ полученных данных и уровня экспрессии генов проводился  $\Delta\Delta C_t$ -методом ( $C_t$  – thresholdcycle = пороговый цикл):

$$\Delta C_{tM} = C_{tMK} - C_{tMv} \text{ и } \Delta C_{tH} = C_{tHK} - C_{tHV}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

где  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tH} - \Delta C_{tM}$ ;

R – относительное изменение уровня экспрессии гена; м – ген-мишень, экспрессия которого исследуется; к – контрольный образец

(получен из растительной ткани, не подвергавшейся никаким обработкам); н – ген-нормализатор (ген, экспрессия которого принимается за постоянную при различных условиях роста растений); в – образец растительной ткани после внешнего модулирующего воздействия.

Дополнительный контроль выхода амплифицированных ДНК-фрагментов проводили методом одномерного горизонтального электрофореза в агарозном геле. Детекцию нуклеиновых кислот, окрашенных бромистым этидием, осуществляли на приборе *Gel-Doc2000* (Bio-Rad). В качестве контроля линейных размеров и количества ДНК использовали маркеры GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus, Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, ФХ174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 и pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker, 23. Исследования подраздела 2.3.4 выполнены на базе лаборатории молекулярной биологии клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (г. Минск) совместно с кандидатом биологических наук Г.В. Ляхновичем.

#### **2.4 Статистическая обработка результатов исследований**

Весь цифровой материал вводился для хранения и обработки в таблицы Microsoft Excel и Statistica-6. Для проверки нормальности распределения применялся W-критерий Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk), специально разработанный для проверки нормальности распределения малых выборок, численностью от 3 до 50 вариантов, основанный на распределении порядковых статистик [Хан, Шапиро, 1969]. Данные, имеющие нормальное распределение, представлены в виде  $M \pm m$ , при этом для определения статистической значимости различий применяли t-критерий Стьюдента. Критическое значение уровня значимости P принималось равным 5%.

### ГЛАВА 3

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИДКОГО СОДЕРЖИМОГО КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Голометаболические насекомые с полным превращением характеризуются тем, что у них между личиночной и взрослой стадиями происходит внезапная и резкая трансформация. Ювенильная личинка (гусеница) по мере роста претерпевает серию линек. В присутствии ювенильного гормона стимулированная экдизоном линька завершается переходом личинки в новый возраст. У личинок последнего возраста синтез ювенильного гормона постепенно прекращается, и его содержание падает ниже порогового уровня. Это событие индуцирует выделение проторокотропного гормона (ПТТГ). Такой гормональный фон переводит клетки на путь, ведущий к окукливанию [222, 223]. Личинка последнего возраста трансформируется в куколку, которая покрыта оболочкой из шелковой нити (кокон). Фаза куколки у дубового шелкопряда (диапауза) продолжается 7–8 месяцев. Куколка не питается, а живет за счет энергии пищи, потребленной личинкой. В куколке происходят процессы гистолиза и гистогенеза [224–227]. До настоящего времени было известно, что гистолиз – это разрушение подлежащих замене в ходе метаморфоза тканей и органов личинки, которое осуществляется при помощи автолиза, лиоцитоза (с помощью лейкоцитов) и фагоцитоза. Гистолизу подвергаются все системы организма личинки, кроме нервной, половой, а также спинного сосуда. В периоде длительной диапаузы молекулы гемолимфы должны быть защищены от свободнорадикальной деструкции и бактериальной контаминации. Гистолиз сменяется гистогенезом, конечной целью которого является построение из жидкого содержимого куколок новых, имагинальных органов. В голометаболических личинках имеются две популяции клеток: личиночные клетки, функционирующие на ювенильных стадиях, и имагинальные клетки, собранные в кластеры, ждущие сигнала, чтобы приступить к дифференцировке. Кроме того, в гемолимфе обнаруживаются, как минимум, 5 типов циркулирующих гемоцитов: прогематоциты (стволовые клетки), плазматоциты и три типа специализированных клеток [228, 229].

Куколки дубового шелкопряда традиционно использовались для получения шелка, а также как биологически полноценный источник пищи [230–232]. В последние 10 лет содержимое куколок дубового шелкопряда рассматривается как перспективный источник биофармацевтических субстанций [233–237]. К настоящему времени расшифрован геном дубового шелкопряда на стадии куколки [238].

Однако биохимические процессы, создавшие условия для сохранения молекул, необходимых для точного гистогенеза в процессе диапаузы, не изучены. Таким образом, не известны механизмы образования компонентов гемолимфы куколок, их сохранения и биологической активности в процессе диапаузы. Выяснение этих механизмов может быть полезным при создании биофармацевтических субстанций, как для подавления жизнедеятельности клеток, так и для их развития в процессе формирования многоклеточного организма.

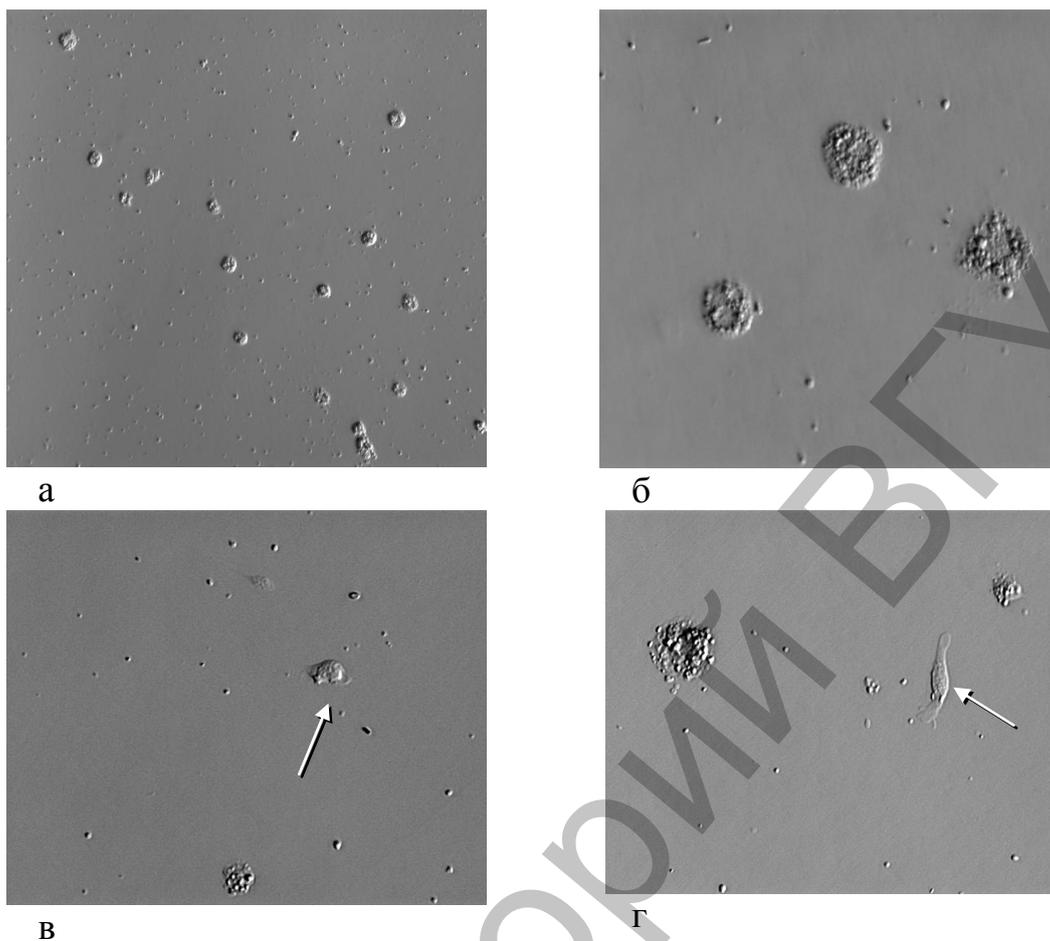
Целью данной главы является 1) выяснение природы механизма обогащения гемолимфы молекулами-предшественниками макромолекул; 2) исследование распада макромолекул в процессе диапаузы; 3) изучение формирования системы антиоксидантной защиты гемолимфы и ее состава.

Использована отечественная моновольтинная порода дубового шелкопряда «Полесский тассар», выведенная в результате многолетней селекционной работы сотрудниками кафедры общей энтомологии и зоологии Украинской ордена Трудового Красного Знамени сельскохозяйственной академии под руководством профессора Н.Н. Синицкого и акклиматизированная к условиям северо-восточной Беларуси сотрудниками кафедры зоологии Витебского государственного университета имени П.М. Машерова на протяжении 40 лет [239, 240].

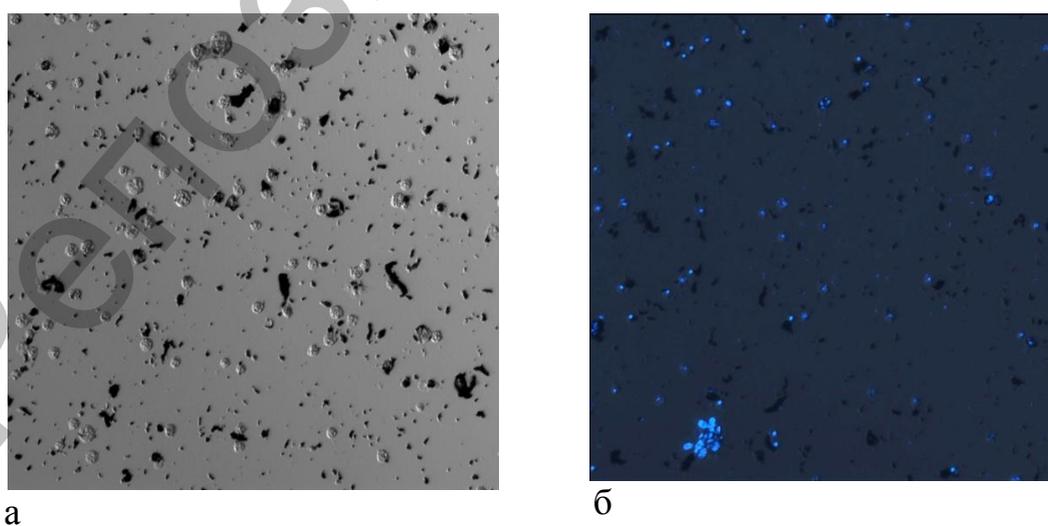
### **3.1 Роль апоптоза в формировании гемолимфы куколок**

Для выяснения механизма гистолиза проведено культивирование клеток жирового тела и гемолимфы, выделенных из куколок в начале диапаузы. При культивировании использовано 5 сред, отличающихся по дополнительным компонентам. В культуре жирового тела после смены среды спустя 1 сутки от посева наблюдались многочисленные округлые слабо распластанные клетки с везикулами в цитоплазме и единичные неправильной формы сильно распластанные (рисунок 3.1). К 6-м суткам сильно распластанных клеток не наблюдалось.

В культуре гемолимфы наблюдались округлые клетки разного размера с менее выраженной зернистостью цитоплазмы по сравнению с преобладающим типом клеток ЖТ (рисунок 3.2 а). Окраска Hoechst-33342 клеток гемолимфы, инкубировавшихся 6 суток в среде 2, выявила в большинстве клеток картину апоптоза – пикнотические или фрагментированные ядра (рисунок 3.2 б).

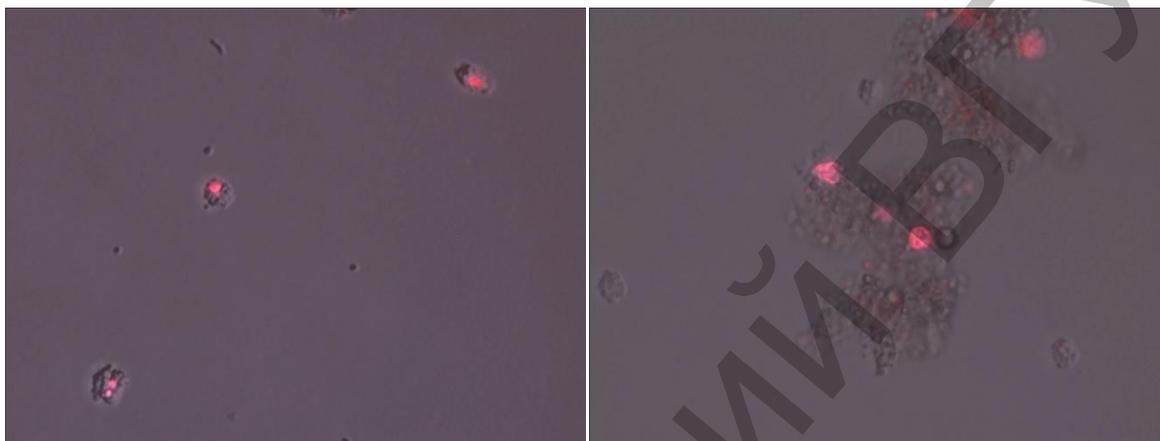


**Рисунок 3.1 – Клетки ЖТ в среде 1: а – 1-е сутки культивирования (увеличение 100х), б – увеличение 400х; в среде 3: в – 1-е сутки культивирования (увеличение 100х), г – увеличение 400х**  
 Примечание – стрелками отмечены распластанные.



**Рисунок 3.2 – Клетки гемолимфы в среде 4: а – 2-е сутки культивирования (увеличение 100х); в среде 2: б – 6-е сутки культивирования, окраска Hoechst-33342 (увеличение 100х)**

При окраске комбинацией красителей Hoechst-33342 и йодистый пропидий (стандартный метод оценки жизнеспособности) клеток гемолимфы, инкубированных 2 суток в среде 5, обнаружено красное (характерное для нежизнеспособных клеток) свечение ядер у всех наблюдавшихся клеток, при этом морфология ядра у большинства была апоптотической (рисунок 3.3). Значительная часть клеток находилась в составе агрегатов.



а

б

**Рисунок 3.3 – Клетки гемолимфы в среде 5:  
а, б – 2-е сутки культивирования, окраска Hoechst-33342  
и йодистым пропидием (увеличение 400х)**

Кристаллы и агрегаты, сформировавшиеся в процессе меланизации гемолимфы, полностью удалить центрифугированием (3000 об./мин 10 минут) и фильтрацией через фильтр 0,2 мкм не удалось.

Приведенные материалы позволяют сделать заключение о том, что из гемолимфы и жирового тела куколок дубового шелкопряда удастся выделить клетки, прикрепляющиеся к культуральному пластику. Однако применявшиеся среды не поддерживали рост и не обеспечивали сохранения жизнеспособности клеток куколок дубового шелкопряда более 1 суток. Следовательно, можно думать о запрограммированном разрушении клеток личинок V возраста по механизмам апоптоза как способе формирования химических составляющих гемолимфы куколок.

### **3.2 Биохимические изменения в гемолимфе куколок на протяжении диапаузы**

В течение диапаузы происходит переход от процессов гистолиза к процессам гистогенеза, что проявляется в виде изменений биохимического состава гемолимфы (таблица 3.1). Исследования проведены

тест-системами сухой химии с помощью анализатора «Рефлотрон IV». Для сравнения в таблице приведены диапазоны нормальных значений изучавшихся показателей в сыворотке крови здоровых людей. Это сделано в связи с тем, что транспорт веществ в жидкой фазе крови ограничен в диапазоне концентраций физико-химическими свойствами транспортируемых веществ и особенностями функционирования транспортных систем. Предположительно, это может относиться и к другим биологическим жидкостям (гемолимфа).

Таблица 3.1 – Динамика некоторых биохимических показателей гемолимфы куколок во время диапаузы (в каждой группе исследовано по 5 куколок)

Показатель	Месяц диапаузы					Сыворотка крови человека
	Сентябрь	Ноябрь	Январь	Февраль	Март	
Глюкоза, ммоль/л	4,05±0,29	5,68±0,58 <sup>1</sup>	4,63±0,73	17,5±1,45 <sup>1</sup>	30,8±2,47 <sup>1</sup>	3,3–5,5
ТГ, ммоль/л	1,92±0,21	2,76±0,32 <sup>1</sup>	4,29±0,55 <sup>1</sup>	3,50±0,15 <sup>1</sup>	2,87±0,24 <sup>1</sup>	0,45–1,80
ОХС, ммоль/л	3,36±0,09	3,47±0,04	3,34±0,07	4,30±0,02 <sup>1</sup>	3,84±0,07	3,63–5,00
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,37±0,07	0,39±0,07	0,76±0,06 <sup>1</sup>	0,51±0,05	0,45±0,06	1,0–1,8
МК, мкмоль/л	196±28	248±52	362±20 <sup>1</sup>	549±38 <sup>1</sup>	806±127 <sup>1</sup>	180–340
Амилаза, Ед/л	390±36	286±13 <sup>1</sup>	45,8±2,15 <sup>1</sup>	66,0±17,8 <sup>1</sup>	52,0±18,9 <sup>1</sup>	0–220
ГГТ, Ед/л	112±5,4	70,6±6,35 <sup>1</sup>	83,9±12,2 <sup>1</sup>	80,0±5,00 <sup>1</sup>	52,7±1,71 <sup>1</sup>	0–49
АлАТ, Ед/л	126±27	147±19	226±24 <sup>1</sup>	144±10	149±26	10–40
АсАТ, Ед/л	86,5±18,3	99,7±25,4	35,9±11,2 <sup>1</sup>	143±31	183±21 <sup>1</sup>	8–20
К, ммоль/л	17,5±5,67	36,2±4,72 <sup>1</sup>	32,8±1,10 <sup>1</sup>	76,0±6,90 <sup>1</sup>	79,0±4,00 <sup>1</sup>	3,4–5,3

Примечание – 1. ТГ – триглицериды, ОХС – общий холестерин, ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, МК – мочевая кислота, ГГТ –  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, АлАТ – аланин-аминотрансфераза, АсАТ – аспартат-аминотрансфераза. 2. <sup>1</sup> –  $P < 0,05$  по сравнению с результатами исследований в сентябре.

Исследуя биохимический состав гемолимфы куколок в разные периоды диапаузы, можно ориентироваться в том, насколько далеко зашли процессы гистолиза. Следует отметить постоянный рост двух показателей во все периоды диапаузы: 1) увеличение концентрации калия, что свидетельствует о перманентном разрушении плазматических мембран клеток и выходе из них калия; 2) увеличение концентрации мочевой кислоты как объективный признак распада пуриновых нуклеотидов и возрастающий по мощности фактор антиоксидантной защиты.

Транспортные формы энергии – глюкоза и триглицериды – имели тенденцию к накоплению, начиная с ноября месяца. Интересно, что увеличение концентрации триглицеридов можно связать с выходом их из разрушающихся клеток с примерно постоянной умеренной скоростью. Рост концентрации глюкозы в 4–7 раз в феврале и марте не мо-

жет рассматриваться как результат распада гликогена, поскольку этот полисахарид распадается чрезвычайно быстро, а активность фермента амилазы снижена до постоянного уровня в январе–марте. Единственным возможным объяснением может быть включение механизма глюконеогенеза в клетках из аминокислот. Этот механизм вполне оправдан, так как глюкоза является основным источником энергии при делении клеток, а также в процессе катаболизма глюкозы от ее метаболитов начинаются многочисленные биосинтетические пути анаболизма [1].

Активность изучавшихся ферментов в гемолимфе была повышена уже в сентябре, что отражает процессы гистолиза тканей гусеницы V возраста и формирования куколки. Затем активность амилазы и ГГТ в гемолимфе снижалась. Активность аминотрансфераз была повышенной на протяжении всей диапаузы. Статистически достоверное повышение активности АлАТ в январе может рассматриваться как результат гистолиза тканей жирового тела, а повышение активности АсАТ в марте, вероятно, является следствием распада мышечной ткани куколки и создания мышечной ткани имаго. Итак, в процессе диапаузы в первой половине происходит распад макромолекул (катаболическая фаза), а во второй половине – биосинтез глюкозы (анаболическая фаза).

Поэтому из гемолимфы куколок дубового шелкопряда можно получать препараты катаболического и анаболического действия в зависимости от периода диапаузы.

Для сохранения молекул гемолимфы в процессе диапаузы необходимы антиоксиданты. Содержание антиоксидантных витаминов в гемолимфе куколок дубового шелкопряда по сравнению с гемолимфой виноградных улиток (*Helix pomatia* L.) представлено в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Содержание антиоксидантных витаминов в гемолимфе (мг/л)

Показатель	Гемолимфа куколок	Гемолимфа улиток
Витамин С	181,5±27,0	15,4±2,76 <sup>1</sup>
Витамин Е	12,5±0,88	15,6±1,54
Витамин А	0,037±0,013	0,018±0,006

Примечание – <sup>1</sup> P<0,05.

Из таблицы 3.2 следует, что в гемолимфе куколок дубового шелкопряда содержание аскорбиновой кислоты выше, чем в гемолимфе виноградных улиток в 10 раз. Аскорбиновая кислота вносит существенный вклад в антиоксидантный потенциал гидрофильных компонентов гемолимфы. В гемолимфе куколок дубового шелкопряда содержатся также (M±σ, мг/л) витамин В<sub>1</sub> (0,011±0,011), витамин В<sub>2</sub> (17,9±6,19), пировиноградная кислота (71,6±11,9), 4-пиридоксильная кислота (0,69±0,062), никотиновая кислота (18,0 мг/л), фолиевая кислота (0,7 мг/л), пантотеновая

кислота (8,2 мг/л), цианкобаламин (0,25 мкг/л), биотин (4,5 мкг/л), каротиноиды (0,4 мг/л) [213, 234]. Поскольку гемолимфа формировалась путем распада клеток и макромолекул, возможно включение механизма накопления продуктов распада, обладающих антиоксидантными свойствами, как показано выше на примере накопления мочевой кислоты [203–205]. В связи с этим был проанализирован белковый и аминокислотный состав гемолимфы куколок.

### 3.3 Белки и аминокислоты гемолимфы куколок

Данные о содержании растворимых белков в теле гусениц (фаза личинки) и куколки представлены в таблице 3.3. Количество растворимых белков достоверно уменьшается в теле гусениц при переходе от возраста I к возрасту V. В теле куколки общее количество растворимых белков возрастает по сравнению с гусеницей V возраста, что, вероятно, связано с гистолизом тканей гусеницы. Содержание общего белка в гемолимфе куколок составляет  $55 \pm 4,0$  г/л (для сравнения содержание общего белка в сыворотке крови человека 65–85 г/л).

Таблица 3.3 – Динамика содержания растворимых белков (г/кг) в фазах личинка–куколка

Фаза личинка (гусеницы)			Куколка (все тело)
I возраст	III возраст	V возраст	
$86,3 \pm 2,04$	$34,7 \pm 1,03^1$	$25,7 \pm 1,25^1$	$63,9 \pm 3,35^{1,2}$

Примечание – <sup>1</sup> P<0,05 по сравнению с гусеницей I возраста; <sup>2</sup> P<0,05 по сравнению с гусеницей V возраста.

Данные о влиянии вида корма (листья дуба черешчатого, березы повислой и ивы) на содержание растворимых белков в тканях гусениц и куколки приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Зависимость содержания растворимых белков в фазах личинка–куколка от вида корма

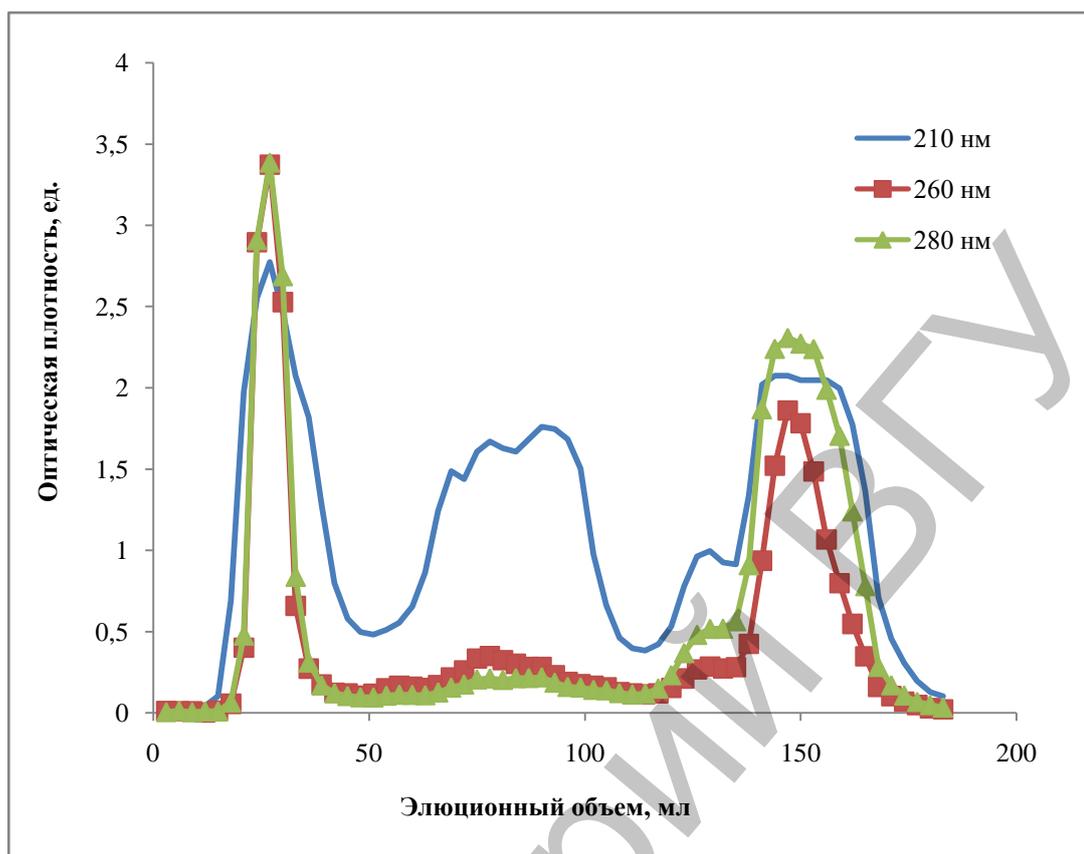
Объект исследования	Листья дуба	Листья березы	Листья ивы
Гусеница I возраста, г/кг	$96,7 \pm 2,35$	$76,0 \pm 2,67^1$	$78,9 \pm 3,56^1$
Гусеница III возраста, г/кг	$38,7 \pm 1,43$	$30,7 \pm 1,52^1$	$31,5 \pm 1,34^1$
Гусеница V возраста, г/кг	$32,4 \pm 1,27$	$25,2 \pm 1,78^1$	$24,9 \pm 1,35^1$
Шелководелятельная железа, г/кг	$59,0 \pm 5,53$	$30,3 \pm 2,78^1$	$53,8 \pm 5,24$
Гемолимфа куколки, г/л	$48,3 \pm 2,34$	$33,5 \pm 3,17^1$	$34,1 \pm 2,98^1$
Жировое тело, г/кг	$40,9 \pm 2,25$	$32,2 \pm 1,75^1$	$62,3 \pm 5,64^1$

Примечание – <sup>1</sup> P<0,05 по сравнению с данными столбца «Листья дуба».

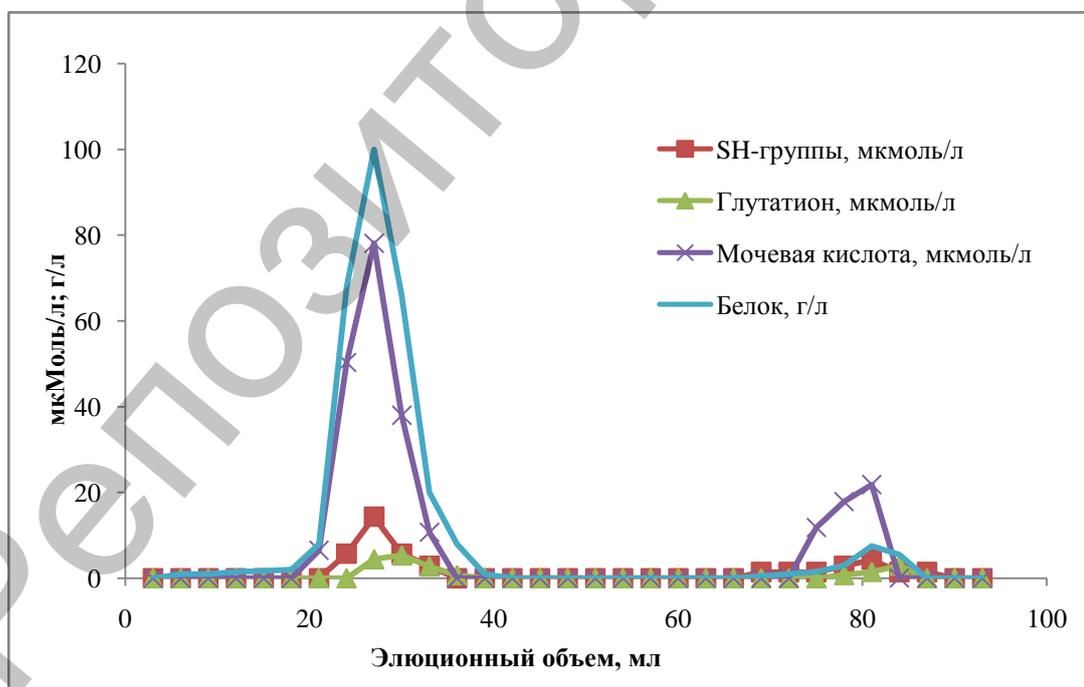
Судя по содержанию растворимых белков в теле гусениц I, III и V возрастов и в гемолимфе куколок, листья дуба являются предпочтительным кормом. Общее содержание растворимых белков в теле куколок и жировом теле оказалось наибольшим при питании гусениц листьями ивы. В теле, жировом теле и гемолимфе куколок-«самок» по сравнению с куколками-«самцами» содержание белков выше на 11,5%, 36% и 54%, соответственно. При анализе относительной электрофоретической подвижности белков гемолимфы куколок шелкопряда определена достаточно высокая гетерогенность растворимых белков. На электрофореграммах отчетливо удается различить от 7 до 9 и более фракций, соответствующих индивидуальным белкам. Питание листьями березы уменьшает степень гетерогенности белков гемолимфы на 22,3% по сравнению с питанием листьями дуба.

При разделении ГКДШ методом гельфильтрации на колонке с сефадексом G-25 fine были выявлены три группы веществ: 1) макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты, полифенолы – фракции 7–13, элюционный объем 21–39 мл); 2) аминокислоты и пептиды (фракции 15–30, элюционный объем 45–90 мл); 3) низкомолекулярные биорегуляторы (фенолы, флавоноиды – фракции 34–52, элюционный объем 102–156 мл). При повторных разделениях различных образцов гемолимфы на колонке с сефадексом G-25 fine хроматографические профили элюции были достаточно близкими. Предположение о наличии трех групп веществ вытекает из анализа данных оптической плотности фракций при определенных длинах волн.

На рисунке 3.4 а представлены оптические плотности фракций при 210, 260 и 280 нм. Из анализа данного рисунка следует, что первый пик содержит белки, полинуклеотиды и полифенольные соединения, а также комплексы белков с низкомолекулярными биорегуляторами ( $A_{280, 260}$ ). Второй пик характеризуется сильным поглощением при 210 нм, что подтверждает предположение о наличии в этой области веществ с молекулярной массой ниже 6000 Да, но имеющих пептидные связи, т.е. пептидов. Из анализа рисунка 3.4 б видно, что белок регистрируется в первом пике (фракции 7–13, элюционный объем 21–39 мл). Следы белка находятся также во фракциях 22–29 второго пика (элюционный объем 66–87 мл). В первых двух пиках выявляются SH-группы, глутатион и мочева кислота. Возможно, что в первом пике выходят ассоциированные с белком трипептид глутатион и мочева кислота. Третий пик содержит низкомолекулярные биорегуляторы фенольной природы, триптофан, биофлавоноиды и другие вещества (фракции 30–40, элюционный объем 90–120 мл). Это подтверждается методом тонкослойной хроматографии на силикагеле – выявлено наличие нескольких флуоресцирующих компонентов гемолимфы (система n-бутанол:уксусная кислота:вода = 4:1:5), являющихся дигидроксихинонами.



а



б

Рисунок 3.4 – Результаты хроматографического разделения гемолимфы на сефадексе G-25 fine: а – оптическая плотность фракций гемолимфы; б – химические компоненты фракций гемолимфы

Общее содержание фенольных соединений в гемолимфе  $246 \pm 4$  мг/л, причем 80% связаны с фракциями макромолекул (7–13) и по 10% представлены во 2 и 3 пиках: фракции 19–29 (элюционный объем 57–87 мл) и фракции 30–40 (элюционный объем 90–120 мл).

Методом ВЭЖХ в гемолимфе куколок и в ее фракциях не удалось обнаружить полифенольный антиоксидант ресвератрол, но обнаружены следы мелатонина. Содержание продуктов пероксидного окисления липидов (ТБКРС) достаточно низкое и составляет  $0,35 \pm 0,17$  нмоль/мг белка. Выявлена активность глутатионпероксидазы, равная  $42 \pm 9,0$  нмоль GSH/мин·мг белка.

Количественную и качественную идентификацию свободных аминокислот и их дериватов гемолимфы куколок шелкопряда проводили катионообменной хроматографией одноколоночным методом по модифицированному методу J.V. Venson, J.A. Paterson (1974) [211]. Спектр свободных аминокислот куколок дубового шелкопряда с учетом кормовой базы гусениц представлен в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Спектр свободных аминокислот гемолимфы куколок дубового шелкопряда (ммоль/л)

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

Примечание – <sup>1</sup>  $P < 0,05$  по сравнению с данными столбца «Питание листьями дуба».

Было показано, что общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л: в том числе обнаружены ( $M \pm m$ , ммоль/л) глутамин

(19,1±1,89), аланин (18,3±2,60), глицин (17,1±0,91), серин (13,1±1,71), треонин (10,3±0,27), гистидин (10,3±0,37), лизин (8,66±0,586), валин (8,16±0,193), пролин (5,59±0,409), лейцин (4,76±0,133), аспарагиновая кислота (4,70±0,561), изолейцин (4,34±0,145), тирозин (2,53±0,230), цитрулин (2,15±0,141), фенилаланин (1,04±0,070), таурин (0,98±0,112), глутаминовая кислота (0,90±0,081), метионин (0,67±0,083), бета-аланин (0,51±0,029), этаноламин (0,23±0,016), орнитин (0,04±0,004). Среди 21 азотсодержащего соединения выявлено 7 незаменимых аминокислот (тре, лиз, вал, лей, иле, фен, мет); 10 могут регулировать редокс-потенциал и оказывать антиоксидантное действие (про, сер, тау, тре, тир, мет, арг, гли, глу, асп); 8 регулировать апоптоз и пролиферацию клеток (лей, иле, вал, ала, сер, тре, арг, мет); 13 имеют отношение к сигнальным молекулам (ала, арг, лей, иле, вал, глу, гли, гис, лиз, мет, фен, про, тир); 11 участвуют в экспрессии генов (про, тре, арг, мет, гли, асп, лей, иле, вал, мет, лиз).

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 [241]. Интересно, что характер кормовой базы может модифицировать аминокислотный состав куколки. 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 [200].

Анализ этих материалов показал, что в гемолимфе куколок дубового шелкопряда в результате гистолиза накапливаются аминокислоты, способные регулировать процессы как в катаболическую, так и анаболическую стадии диапаузы, а также препятствовать действию АФК.

Количественную и качественную идентификацию свободных аминокислот и их дериватов в пептидсодержащих фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда (фракции 17–33, элюционный объем 51–99 мл) проводили обращенно-фазовой хроматографией. Было выделено 6 групп аминокислот (рисунок 3.5). В первую группу вошли аминокислоты, выделяемые в высокой концентрации (500–2500 мкмоль/л фракции). В этой группе оказались основные (положительно заряженные) аминокислоты – гистидин, лизин и аргинин), а также серин, глицин и цистатионин. В наибольшей концентрации были гистидин, глицин и серин. Все эти аминокислоты выходили с элюционным объемом 60–95 мл, причем было достигнуто хорошее разделение глицина и гистидина. Среди выделенных аминокислот лизин является абсолютно незаменимой аминокислотой, а гистидин и

аргинин считаются незаменимыми в периоде роста и развития организма млекопитающих.

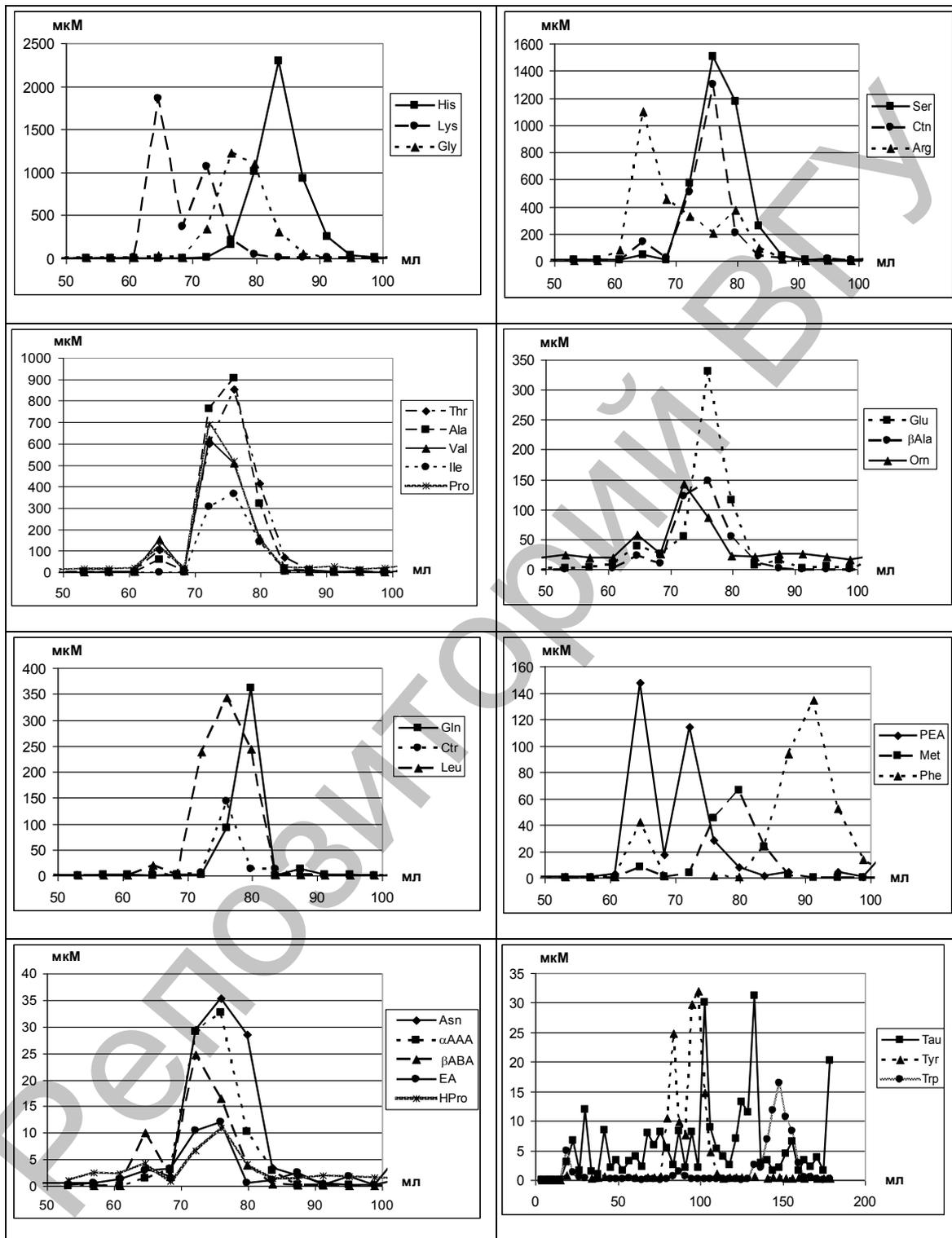


Рисунок 3.5 – Профиль элюции аминокислот, содержащихся во фракциях гемолимфы, в зависимости от их концентрации

Во вторую группу вошли 5 аминокислот, которые выделялись в диапазоне концентраций 100–900 мкмоль/л: треонин, аланин, валин, изолейцин и пролин. Основное количество аминокислот второй группы выходило с элюционным объемом 70–85 мл. В наибольшем количестве определялись треонин и аланин, а в наименьшем – изолейцин. Во второй группе оказались три незаменимые аминокислоты – треонин, валин и изолейцин. В третью группу вошли аминокислоты, выделяемые при гель-хроматографии в диапазоне концентраций 50–350 мкмоль/л. Третья группа свободных аминокислот выходила с тем же элюционным объемом, что и вторая. В нее условно включены 6 аминокислот, в том числе одна незаменимая – лейцин. Четвертую группу составили три аминокислоты, содержащиеся в диапазоне концентраций 20–140 мкмоль/л. Эти аминокислоты выходили в диапазоне элюционного объема 60–100 мл и достаточно хорошо разделялись в последовательности: фосфоэтаноламин, метионин, фенилаланин. Две последние аминокислоты являются незаменимыми. Пятую группу составили 5 аминокислот и азотсодержащих метаболитов, выделяемых в концентрации 5–35 мкмоль/л. Эти низкомолекулярные метаболиты выходят с элюционным объемом 70–85 мл, среди них нет незаменимых аминокислот.

Последнюю шестую группу составили 6 низкомолекулярных азотсодержащих веществ, выделяемых в диапазоне концентраций 5–35 мкмоль/л, но обладающих особенностями при разделении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: триптофан выходит в большом элюционном объеме, а таурин, аспарагиновая кислота, тирозин представлены несколькими пиками. В шестую группу аминокислот включены триптофан (незаменимая аминокислота) и таурин, обладающий антиоксидантным действием.

Методом ВЭЖХ было показано, что из куколок дубового шелкопряда можно получить полный набор протеиногенных аминокислот, включая все незаменимые аминокислоты. Иными словами, как сама куколка, так и препараты, полученные путем термического или гель-хроматографического удаления белков, являются сбалансированными аминокислотными композициями, которые могут применяться как для обеспечения биосинтеза белков, так и для молекулярной регуляции жизненно важных процессов. Следует отметить, что безбелковые гидрофильные препараты из куколок содержат природные композиции аминокислот в высокой концентрации, и они лишены факторов, влияющих на реактивность систем иммунитета и гуморальной регуляции функций млекопитающих (отсутствие специфических для насекомых белков и стероидов и других липофильных биорегуляторов).

### 3.4 Гистолиз тканей и антиоксидантная активность гемолимфы куколок

Работа базируется на гипотезе, согласно которой в живых организмах окислительный стресс вызывает распад белков, нуклеиновых кислот, гемопротеинов, ведущий к освобождению низкомолекулярных веществ (аминокислот, мочевой кислоты, билирубина), обладающих антиоксидантным действием. В данном подразделе монографии сделана попытка подтвердить эту гипотезу на примере динамики антиоксидантной активности в течение гистолиза гусениц V возраста, ведущего к образованию жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда, а также при сравнительном анализе антиоксидантной активности гемолимфы куколок с аналогичной активностью гемолимфы виноградных улиток, расплода пчел и лекарственных растений.

Было изучено влияние гемолимфы куколки и гусеницы V возраста дубового шелкопряда на генерацию  $HO\cdot$  при взаимодействии  $FeSO_4$  (50 мкмоль/л) и  $H_2O_2$  (50 мкмоль/л) (рисунок 3.6).

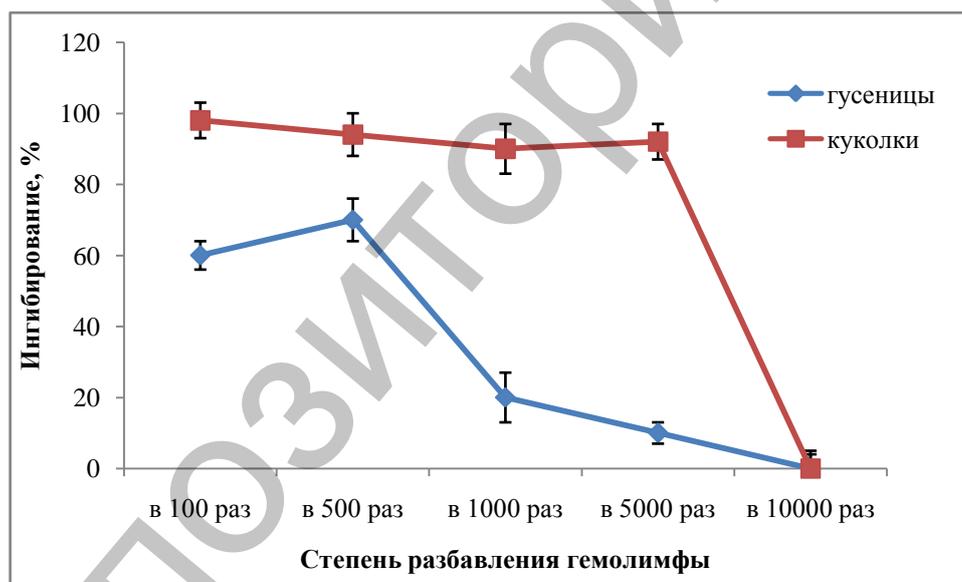


Рисунок 3.6 – Влияние степени разбавления гемолимфы куколок и гусениц дубового шелкопряда на генерацию  $HO\cdot$  в реакции Фентона [2–А]

Обнаружено, что оба образца гемолимфы ингибировали реакцию. Причем гемолимфа куколок в 10 раз сильнее ингибировала процесс, чем гемолимфа гусениц: 50% ингибирование наблюдалось при разбавлении содержимого гусениц в 550 раз, а содержимого куколок – приблизительно в 5000 раз. Следовательно, получено первое подтверждение высказанной гипотезы.

Далее был проведен комплекс исследований антиоксидантной активности ГКДШ с использованием сегментоядерных нейтрофильных эритроцитов человека. Вначале был осуществлен поиск ингибирующего действия гемолимфы куколок на люминол-опосредованную ХЛ (Люм-ХЛ) стимулированных нейтрофилов (рисунок 3.7).

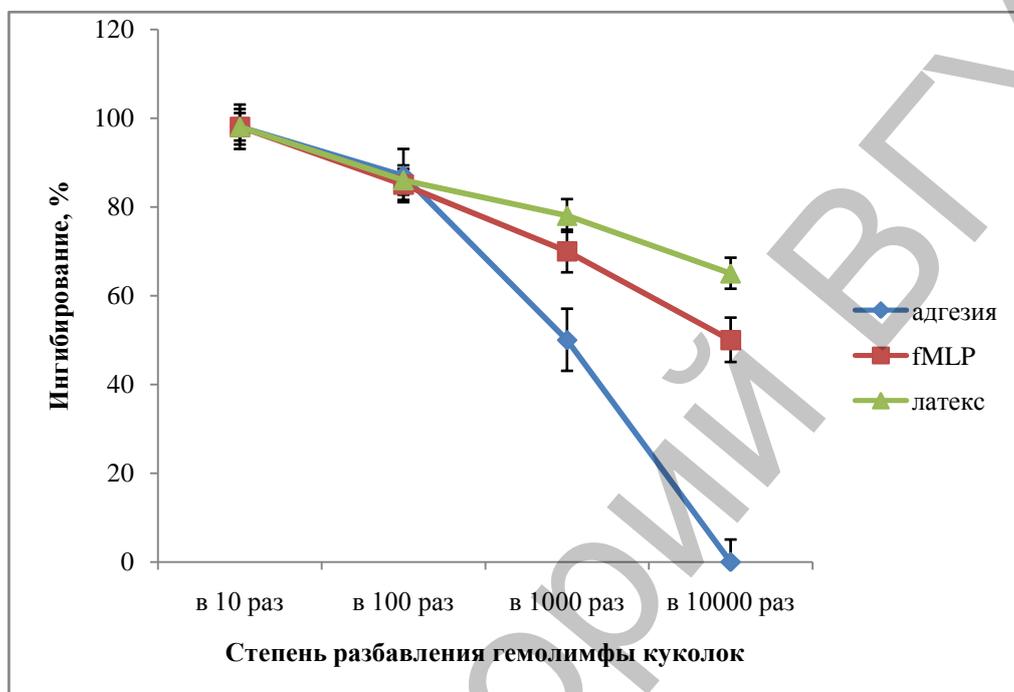


Рисунок 3.7 – Ингибирующее действие гемолимфы куколок на Люм-ХЛ стимулированных нейтрофилов

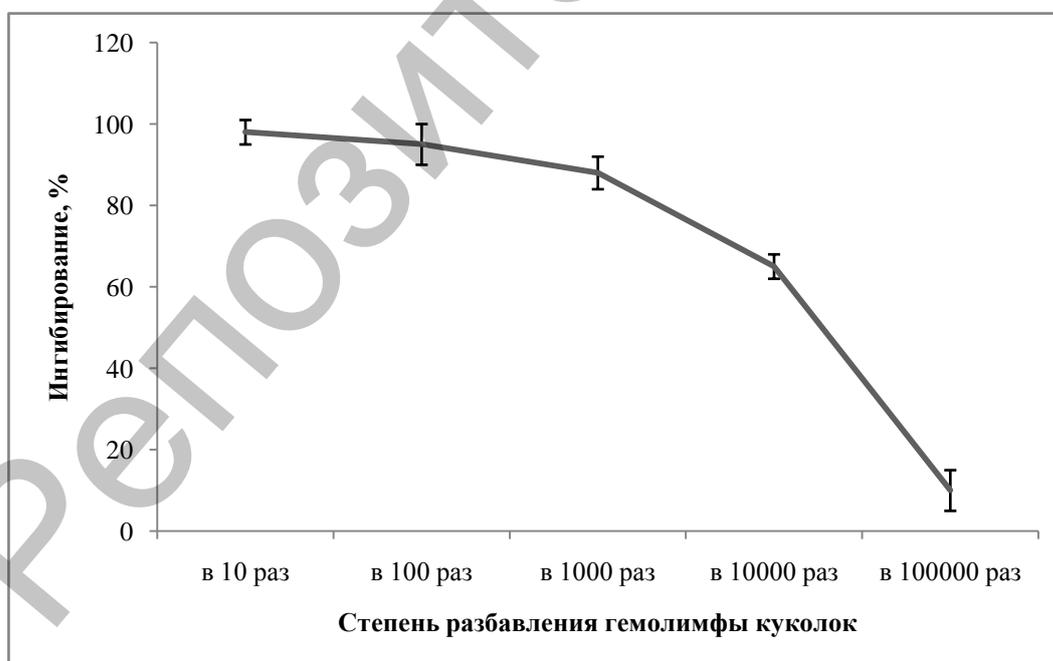
В специальных экспериментах была изучена способность нейтрофилов генерировать АФК после предварительного инкубирования клеток с гемолимфой куколок в течение 40 мин при 37°C и последующей отмывкой клеток. Оказалось, что способность формировать АФК у нейтрофилов, инкубированных без гемолимфы, и клеток, инкубированных с гемолимфой, а затем отмытых, практически не различается. Это свидетельствует о том, что компоненты гемолимфы куколок не сорбируются клетками и не приводят к снижению способности клеток генерировать активные формы кислорода в ответ на стимуляцию.

Исследование Люм-ХЛ нейтрофилов при добавлении 2 мкл разбавленной в 20 раз гемолимфы дубового шелкопряда показало, что происходит снижение выхода АФК как в случае активации клеток в ходе адгезии, так и при воздействии fMLP и латекса. Обнаружено, что ингибирующий эффект гемолимфы в отношении генерации клетками АФК, вызванной действием латекса и fMLP, значительно выше, чем в отношении активации клеток в ходе адгезии к стеклу. Выход АФК, генерируемых при адгезии, снижается на 50% при количестве гемо-

лимфы в среде, соответствующем разбавлению в 500 раз, а при воздействии на нейтрофилы fMLP и латекса снижение выхода АФК на 50% наблюдается при разбавлении гемолимфы более, чем в  $10^4$  раз.

Возникающее свечение является следствием взаимодействия люминола с АФК ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ;  $^1O_2$ ,  $OCl^-$ ,  $ONOO^-$ ), генерируемыми активируемыми нейтрофилами. Хорошо изученным хемилюминесцентным индикатором формирования  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  является люцигенин. С целью уточнения мишеней действия компонентов гемолимфы было изучено его влияние на Люц-ХЛ нейтрофилов. Установлено, что гемолимфа дубового шелкопряда не оказывает значительного влияния на интенсивность Люц-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии, действии латекса и fMLP. Разница между Люм-ХЛ и Люц-ХЛ характеризует участие в генерации АФК миелопероксидазы, поскольку люцигенин, в отличие от люминола, не окисляется МПО, не взаимодействует с  $OCl^-$  и другими продуктами МПО. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии гемолимфы на МПО-зависимую генерацию АФК нейтрофилами [204].

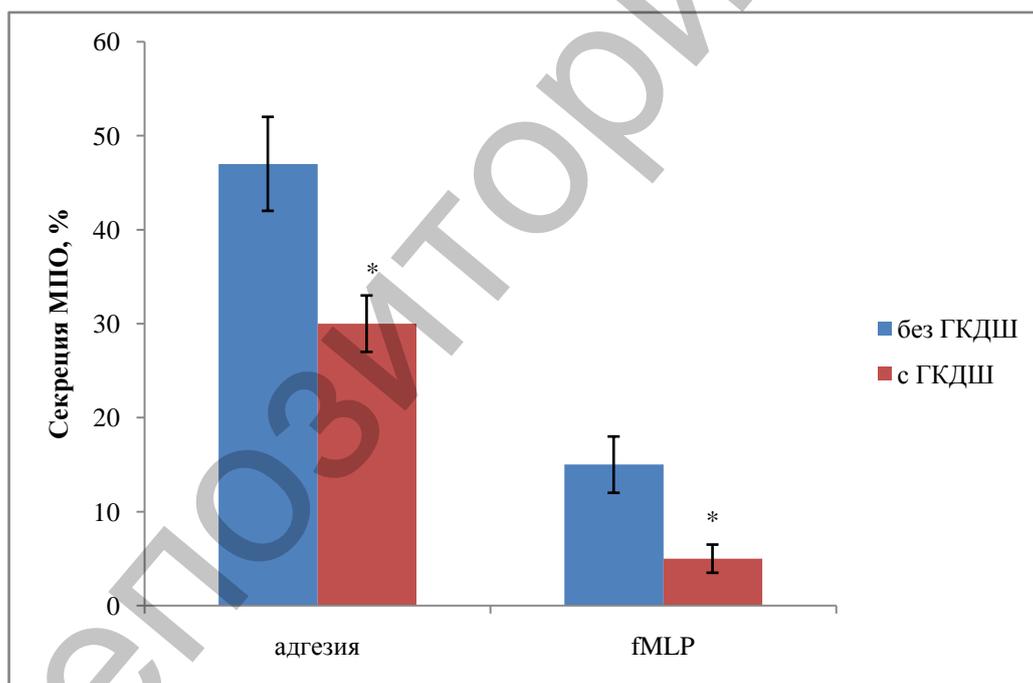
На рисунке 3.8 представлена зависимость, характеризующая влияние гемолимфы на окисление люминола пероксидом водорода в присутствии миелопероксидазы разрушенных нейтрофилов. Как и в случае цельных жизнеспособных нейтрофилов, при действии на фермент МПО разрушенных клеток компоненты гемолимфы куколок также ингибировали способность МПО катализировать окисление люминола.



**Рисунок 3.8 – Зависимость ингибирующего действия ГКДШ на Люм-ХЛ в системе «люминол +  $H_2O_2$  + МПО разрушенных нейтрофилов» от степени разбавления гемолимфы [3–А]**

Ингибирование на 50% наблюдали при добавлении гемолимфы в количестве, соответствующем разбавлению более чем в  $10^4$  раз. Следовательно, компоненты гемолимфы куколок дубового шелкопряда могут напрямую влиять на МПО-зависимые реакции.

Миелопероксидаза в покоящихся нейтрофилах локализована в азурофильных лизосомальных гранулах и вовлекается в процессы генерации АФК только после высвобождения из гранул при активации клеток. Миелопероксидаза, 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. На рисунке 3.9 показано влияние гемолимфы 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  $37^{\circ}\text{C}$  в отсутствие или присутствии гемолимфы, а затем проведена оценка высвобождения МПО во внеклеточную среду в процентах по отношению к полному содержанию МПО в нейтрофилах.



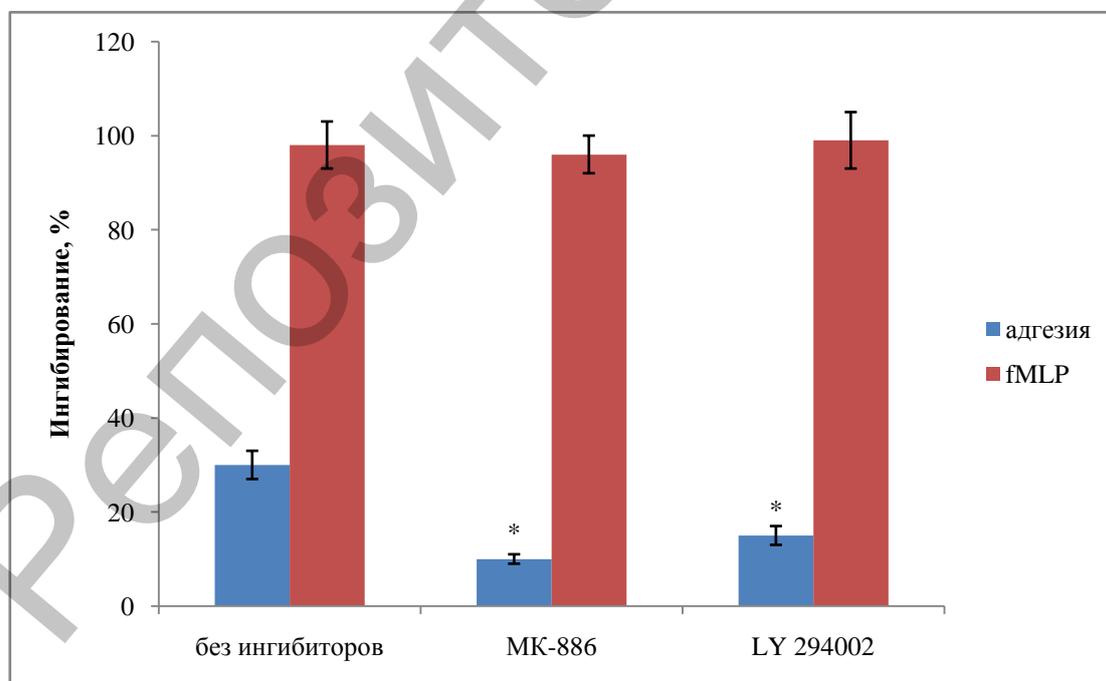
**Рисунок 3.9 – Влияние ГКДШ на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток: в процессе адгезии (1) и при действии fMLP (2) [3–А]**

Как видно из рисунка 3.9, гемолимфа куколок дубового шелкопряда тормозила секрецию МПО во внеклеточную среду при активации клеток в процессе адгезии и при действии fMLP. По-видимому, влияние гемолимфы на процессы активации кислорода в нейтрофилах

не ограничивается прямым взаимодействием компонентов гемолимфы с МПО и ее продуктами, но и включает 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 гемолимфы по высвобождению лактатдегидрогеназы. ЛДГ является цитозольным ферментом и может оказываться во внеклеточной среде только вследствие нарушения барьерной функции плазматической мембраны клетки. Проведенные исследования показали, что гемолимфа в использованных разведениях не приводит к усилению высвобождения из нейтрофилов ЛДГ и, следовательно, не вызывает разрушения нейтрофилов по механизму некроза.

Фосфатидил-инозитол-3-киназа (ФИ-3-К) и 5-липоксигеназа (5-ЛО) являются важными внутриклеточными ферментами, регулирующими процессы сборки НАДФН-оксидазных комплексов, дегрануляцию нейтрофилов, а также гибель нейтрофилов по механизму апоптоза. Была изучена зависимость действия гемолимфы на генерацию нейтрофилами АФК от ингибиторов 5-ЛО и ФИ-3-К. На рисунке 3.10 представлены данные, отражающие ингибирующее действие компонентов гемолимфы на Люм-ХЛ нейтрофилов в отсутствие и присутствии в среде МК-886 (блокатор активации 5-ЛО) или LY 294002 (ингибитор ФИ-3-К) в случае активации клеток при адгезии и действии fMLP.



**Рисунок 3.10 – Ингибирующий эффект ГКДШ в отношении Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в отсутствие и присутствии МК-886 ( $2 \cdot 10^{-6}$  моль/л) и LY 294002 ( $1,7 \cdot 10^{-7}$  моль/л) [3–А]**

Как видно из рисунка 3.10, ингибирующий эффект компонентов гемолимфы на генерацию АФК при действии fMLP слабо зависит от МК-886 и LY 294002. В то же время ингибирующее действие гемолимфы на образование АФК при активации нейтрофилов в процессе адгезии значительно снижается при блокировании 5-ЛО и ФИ-3-К.

Такой результат подтверждает, что действие гемолимфы не ограничивается лишь влиянием на активность МПО, но и включает изменение процессов внутриклеточной сигнализации [204].

Полученные данные позволили сделать следующее заключение. Гемолимфа куколок дубового шелкопряда приводит к ингибированию процессов генерации нейтрофилами АФК путем непосредственного ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции из нейтрофилов МПО во внеклеточную среду. Ингибирующий эффект в отношении образования нейтрофилами АФК при действии латекса и fMLP многократно превышает величину воздействия гемолимфы на активацию нейтрофилами кислорода при адгезии. Действие гемолимфы на нейтрофилы частично зависит от функционирования 5-ЛО и ФИ-3-К внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток [203, 242, 243].

Для оценки уникальности выявленного антиоксидантного эффекта у гемолимфы куколок дубового шелкопряда был произведен поиск аналогичной активности гемолимфы виноградных улиток. На рисунках 3.11 и 3.12 представлены данные о влиянии гемолимфы на генерацию активных форм кислорода стимулированными нейтрофилами человека.

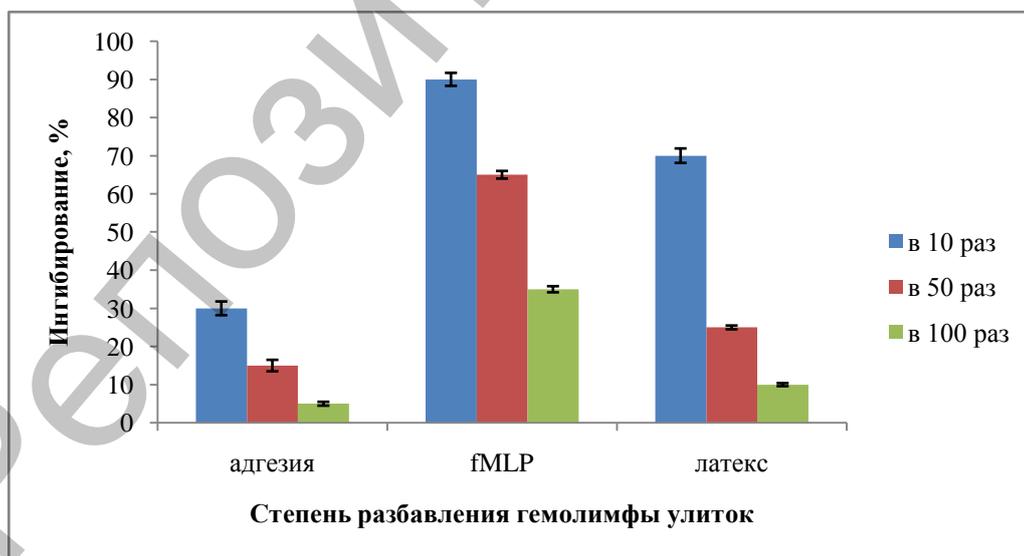


Рисунок 3.11 – Влияние ГВУ на генерацию АФК стимулированными нейтрофилами [2–А]

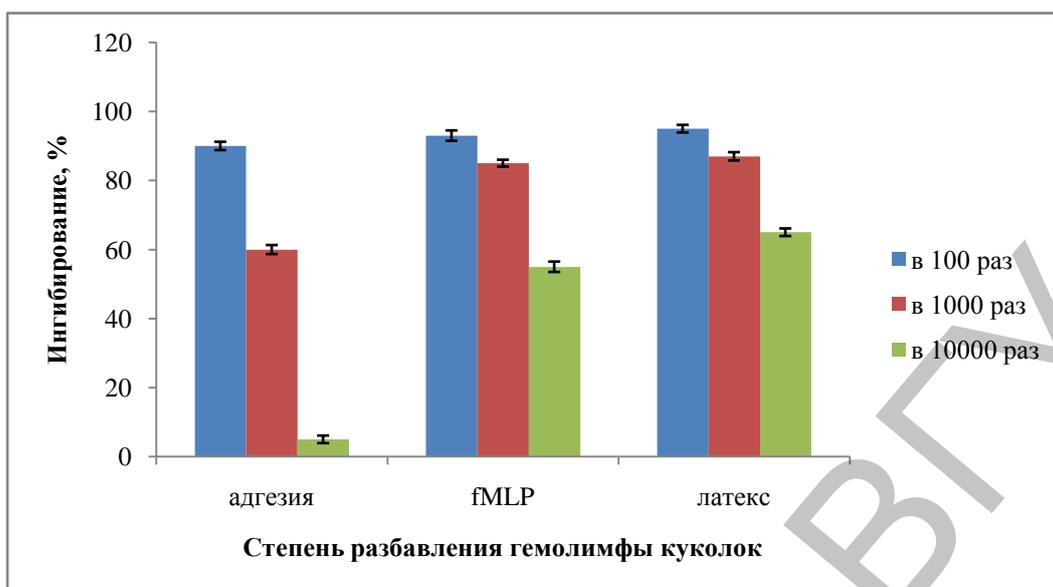


Рисунок 3.12 – Влияние ГКДШ (4–6) на генерацию АФК стимулированными нейтрофилами [2–А]

На рисунках 3.13 и 3.14 представлены данные, показывающие наличие значительно более выраженного антиоксидантного эффекта гемолимфы куколок дубового шелкопряда по сравнению с гемолимфой виноградных улиток на модели окисления люминола бесклеточными системами.

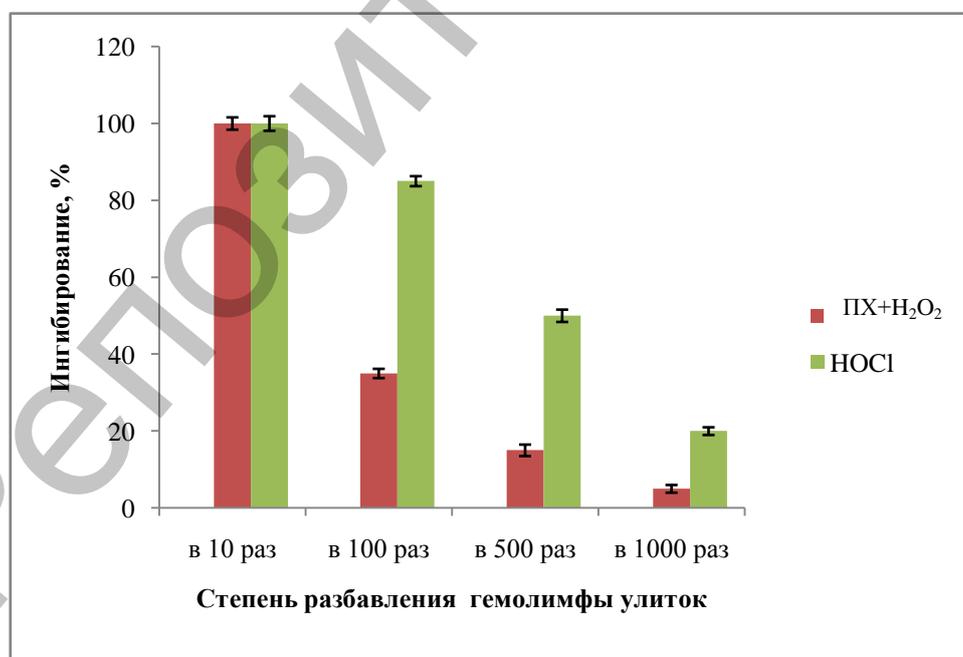


Рисунок 3.13 – Влияние ГВУ на окисление Люм при действии пероксидазы хрена с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и НОСІ [2–А]

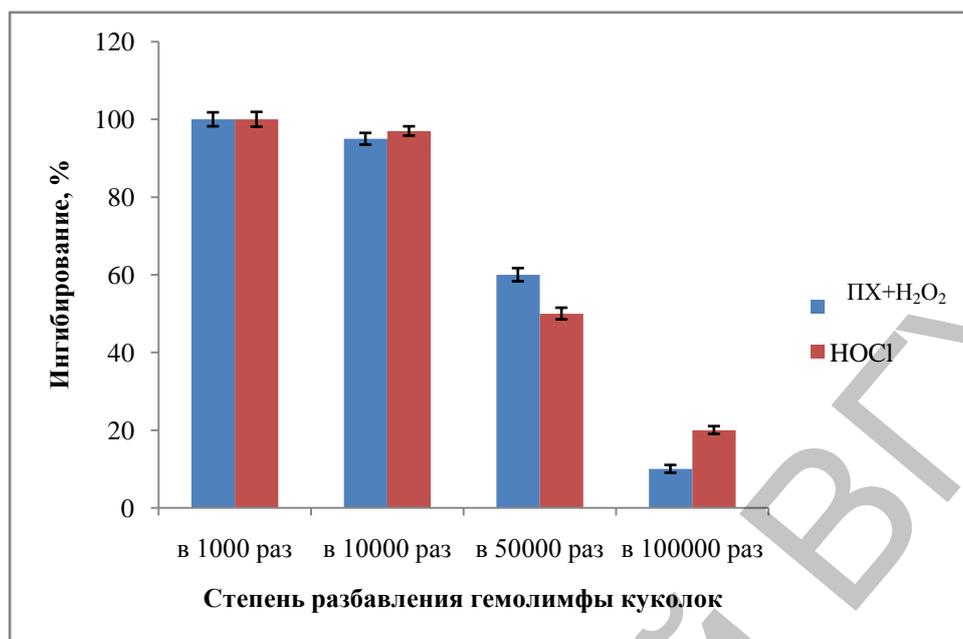


Рисунок 3.14 – Влияние ГКДШ на окисление Люм при действии пероксидазы хрена с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и HOCl [2–А]

Сравнительный анализ антиоксидантной эффективности гемолимфы куколок дубового шелкопряда и гемолимфы виноградных улиток приведен в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Разбавления гемолимфы, при которых наблюдалось 50% ингибирование образования АФК

Модельные системы	Улитки	Шелкопряд	Отношение
люминол + HOCl	500	100000	200
люминол + пероксидаза хрена + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60	12500	~200
люминол + миелопероксидаза + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40	20000	500
генерация АФК нейтрофилами при адгезии	1	700	700
генерация АФК нейтрофилами при действии fMLP	35	10000	~300
генерация АФК нейтрофилами при действии латекса	10	40000	4000

При вычислении 50% ингибирования образования АФК показано, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + HOCl в 200 раз, люминол + пероксидаза хрена + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 200 раз, люминол + миелопероксидаза + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 500 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при адгезии в 700 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии fMLP в 300 раз и генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии латекса в 4000 раз. Следова-

тельно, ингибирующее действие гемолимфы дубового шелкопряда наблюдается при степени ее разбавления на несколько порядков более высокой, чем у виноградных улиток [244].

Приведенные результаты свидетельствуют о существенно более мощных антиоксидантных свойствах гемолимфы куколок дубового шелкопряда по сравнению с гемолимфой гусениц V возраста или виноградных улиток. Это может быть связано с увеличением концентрации продуктов распада нуклеиновых кислот (в частности мочевой кислоты) и белков (аминокислот, отвечающих за антиоксидантные эффекты) [204, 242].

Для дальнейшего доказательства уникальности антиоксидантной активности продуктов гистолиза было проведено сравнение с результатами аналогичных исследований с использованием гомогената расплода пчел (ГРП). Было установлено: 1) достоверное уменьшение относительно контроля интенсивности Люц-ХЛ нейтрофильных лейкоцитов, характеризующей образование клетками  $O_2^-$ , выявляется при действии ГРП в концентрации 1 мл/л; 2) при действии ГРП в концентрациях 1 мл/л наблюдается снижение суммарной генерации АФК нейтрофилами (с участием НАДФН-оксидазы и МПО) приблизительно на 50% при активации клеток как при адгезии, так и действии хемотаксического фактора fMLP и стимулятора фагоцитоза латекса [245]. Следовательно, гомогенат расплода пчел уступает антиоксидантной активности гемолимфы куколок дубового шелкопряда в 100–1000 раз.

В середине 90-х годов прошлого века начала разрабатываться концепция метаболической терапии с применением не только синтетических метаболитов – лекарственных средств, но и природных композиций биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов [246–249]. К таким средствам относили вещества из солянки холмовой, расторопши и многие другие. Использование этих лекарственных композиций существенно снизило заболеваемость лиц, подверженных действию хронического нервно-психического напряжения [250]. Однако без четкой привязанности фармакодинамики химических компонентов растений к тем или иным структурам вторичных метаболитов развитие метаболической терапии невозможно [251].

Целью следующего этапа явилось ранжирование лекарственных растений по выраженности антиоксидантной активности при моделировании окислительного стресса у нейтрофильных лейкоцитов и сравнение этой активности с гемолимфой куколок дубового шелкопряда. В качестве объектов исследования были использованы 25 растений, приведенных в таблице 3.7. В этой таблице также указаны основные группы биологически активных веществ этих растений, ответственные за их фармакологию.

Таблица 3.7 – Исследуемые лекарственные растения

Русское название	Латинское название	Действующие вещества
Зверобой продырявленный, трава	<i>Hypericum perforatum</i>	Антрахиноны, флавоноиды, проантоцианидины
Лабазник вязолистный, цветки	<i>Filipendula ulmaria</i>	Флавоноиды
Рута душистая, трава	<i>Ruta graveolens</i>	Алкалоиды, флавоноиды
Донник лекарственный, трава	<i>Melilotus officinalis</i>	Кумарины, флавоноиды
Пустырник сердечный, трава	<i>Leonurus cardiaca</i>	Флавоноиды, иридоиды
Эхинацея пурпурная, трава	<i>Echinacea purpurea</i>	Коричные кислоты, полисахариды
Пижма бальзамическая (Кануфер) трава	<i>Tanacetum balsamita</i>	Эфирное масло, флавоноиды
Черда трехраздельная, трава	<i>Biden stripartita</i>	Флавоноиды, полиацетилены, полисахариды
Брусника обыкновенная, листья	<i>Vaccinium vitisidaea</i>	Фенолгликозиды, флавоноиды, таннины
Береза пушистая, листья	<i>Betula pubescens</i>	Флавоноиды, таннины
Чистотел большой, трава	<i>Chelidonium majus</i>	Алкалоиды, флавоноиды
Каштан, семена	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Сапонины
Буквица лекарственная, трава	<i>Betonica foliosa</i>	Флавоноиды, иридоиды
Кукуруза, рыльца	<i>Zea mays</i>	Флавоноиды
Крапива двудомная, листья	<i>Urtica dioica</i>	Коричные кислоты, флавоноиды
Маклея сердцевидная, листья	<i>Macleaya cordata</i>	Алкалоиды, флавоноиды
Малина обыкновенная, листья	<i>Rubus idaeus</i>	Флавоноиды, таннины
Репешок аптечный, трава	<i>Agrimonia eupatoria</i>	Флавоноиды, таннины
Хвощ полевой, трава	<i>Equisetum arvense</i>	Флавоноиды
Лещина обыкновенная, листья	<i>Corylus avelana</i>	Флавоноиды, таннины
Фиалка трехцветная, трава	<i>Viola tricolor</i>	Флавоноиды, эфирное масло
Сабельник болотный, корневища	<i>Comarum palustre</i>	Проантоцианидины, флавоноиды
Каштан, цветки	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Флавоноиды, кумарины
Полынь божье дерево, трава	<i>Artemisia abrotanum</i>	Флавоноиды, эфирные масла
Левзея сафлоровидная, листья	<i>Leuzea carthamoides</i>	Экдистероиды, флавоноиды

Водные экстракты растений готовили следующим образом: измельченное растительное сырье (100 мг) заливали дистиллированной водой (20 мл) и выдерживали на водяной бане (100°C) в течение 15 минут, затем настаивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Полученные суспензии фильтровали, получая в результате прозрачные желтовато-коричневые экстракты без мутных примесей.

Поскольку работа с клеточным материалом требует значительных затрат времени и средств, предварительную оценку антиокислительных свойств различных веществ на генерацию АМК в нейтрофилах можно выполнять на бесклеточных системах, содержащих пероксидазы и их субстраты, что позволяет снизить затраты на исследования. Было проведено изучение свойств экстрактов растений с использованием бесклеточной системы «пероксидаза хрена + пероксид водорода + люминол», в которой пероксидазное окисление люминола пероксидом водорода также сопровождается возникновением люминол-зависимой хемилюминесценции.

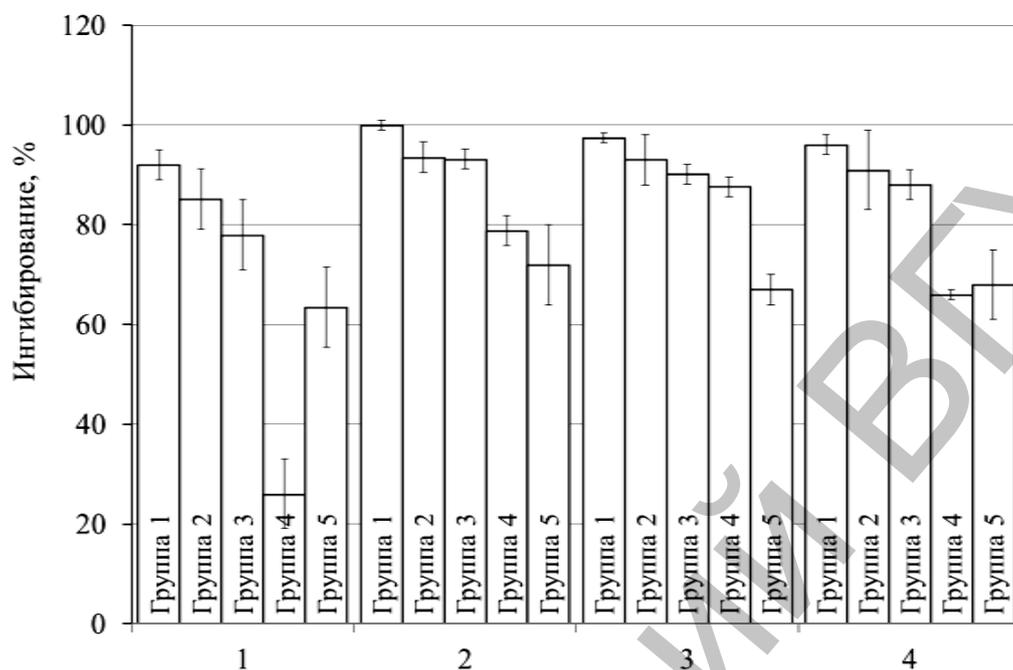
Обнаружено, что в присутствии экстрактов исследованных растений имеет место снижение интенсивности Люм-ХЛ. Для количественной оценки способности веществ подавлять реакцию пероксидазного окисления были изучены концентрационные зависимости и определены концентрации экстрактов, при которых наблюдается 50% ингибирование Люм-ХЛ. Диапазон использованных концентраций – от 0,001 мкл/мл до 50 мкл/мл экстракта в образце. На основании полученных результатов все объекты были разделены на группы, как указано в таблице 3.8. К группам 1–5 относили растения по мере ослабления антиокислительных свойств их экстрактов. В группу 6 включены растения, экстракты которых приводили не к ослаблению, а повышению интенсивности Люм-ХЛ.

Таблица 3.8 – Разделение растений на группы по способности ингибировать реакции окисления, катализируемые пероксидазой

Группа 1	Зверобой, лабазник, рута ( $C_{50} < 0,001$ мкл/мл)
Группа 2	Донник, пустырник ( $C_{50}$ от 0,001 до 0,01 мкл/мл)
Группа 3	Эхинацея, кануфер, череда, брусника, береза, чистотел ( $C_{50}$ от 0,01 до 0,05 мкл/мл)
Группа 4	Каштан (плоды), буквица, кукурузные рыльца, крапива, маклея, малина, репешок ( $C_{50}$ от 0,05 до 0,1 мкл/мл)
Группа 5	Хвощ, фиалка ( $C_{50}$ более 0,1 мкл/мл)
Группа 6	Лещина, сабельник, каштан (цветы), божье дерево, левзея

Для исследований способности экстрактов растений снижать интенсивность генерации АФК активированными нейтрофилами были применены концентрации экстрактов 50 мкл на 1 мл пробы. Ингиби-

рующее действие экстрактов рассчитывали в процентах относительно контроля.



**Рисунок 3.15 – Влияние экстрактов растений на Люм-ХЛ нейтрофилов, стимулированных в ходе адгезии (1), при действии fMLP (2) и латекса (3), усредненные значения первых 3-х параметров для каждого экстракта (4) [8–А]**

На рисунке 3.15 и в таблице 3.9 представлены данные, характеризующие влияние экстрактов растений на Люм-ХЛ нейтрофилов, обусловленную генерацией активированными клетками АФК, при внесении экстрактов лекарственных трав.

Таблица 3.9 – Влияние экстрактов растений на Люм-ХЛ нейтрофилов, обусловленную генерацией АФК активированными клетками, при внесении в концентрации 50 мкл экстракта на 1 мл суспензии

Группа растений	Ингибирование генерации АФК в нейтрофилах, %			
	При адгезии клеток	При активации клеток fMLP	При фагоцитозе латекса	Среднее значение
Группа 1	92±3	100±1	97±1	96±2
Группа 2	85±6	94±3	93±5	91±8
Группа 3	78±7	93±2	90±2	88±3
Группа 4	26±7	79±3	88±2	66±1
Группа 5	64±8	72±8	67±3	68±7

Как видно из данных, представленных на рисунке 3.15 и в таблице 3.9, при внесении экстрактов в дозе 50 мкл на 1 мл суспензии нейтрофилов (содержание клеток 1 млн/мл) экстракты растений, отнесенных к группам 4 и 5, вызывают более слабые эффекты, чем экстракты групп 1–3. Наибольшие ингибирующие эффекты выявлены при действии экстрактов растений группы 1, снижавших выход АФК на 90–100%.

Отмечено, что концентрации экстрактов растений, необходимые для ингибирования генерации АФК клетками, на несколько порядков выше, чем концентрации, необходимые для ингибирования пероксидазного окисления непосредственно в среде (бесклеточной). Причиной подобных различий может быть препятствующее действие клеточных мембран проникновению компонентов экстрактов внутрь клеток.

Таким образом, показано, что наибольшим антиоксидантным действием, способностью ингибировать активность пероксидаз и подавлять активность нейтрофилов при адгезии, действии хемоаттрактанта и при индуцировании фагоцитоза обладают водные экстракты зверобоя, лабазника, руты. Однако следует отметить, что в результате проведенных исследований тесной связи между химической природой основной группы действующих веществ и антиоксидантной активностью растений не удалось выявить. По-видимому, это обусловлено наличием конкретных соединений из каждой большой группы химических веществ (например, гиперфорином и гиперидинами в траве зверобоя, флавоноидом спиреозидом в цветках лабазника и т.д.). В настоящее время данные об их сравнительной антиоксидантной активности отсутствуют. При сравнении с гемолимфой куколок дубового шелкопряда растения первой группы (зверобой продырявленный – трава, лабазник вязолистный – цветки, рута душистая – трава) уступают по антиоксидантной активности, как минимум, в 2,5–10 раз.

Таким образом, можно констатировать, что продукты гистолиза на порядок отличаются по выраженности антиоксидантного действия по сравнению с исходными образцами гемолимфы гусениц V возраста или (для сравнения) с гемолимфой виноградных улиток, гомогенатом расплода пчел и экстрактами лекарственных растений.

## ГЛАВА 4

# БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОДЕРЖИМОГО КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

Исследование антиоксидантной активности различных синтетических и природных антиоксидантов наиболее эффективно на клеточном уровне [252, 205, 253]. Для оценки антиоксидантной активности наиболее перспективен метод хемилюминесценции [6]. В последние годы было показано, что оболочки кокона дубового шелкопряда являются преградой, способной противостоять микробной контаминации и действию АФК. Эту функцию выполняют регулируемые поры оболочек [254]. Однако данные барьеры не обеспечивают абсолютной защиты. Поэтому эволюционно отбирались и закреплялись вещества, обеспечивающие защиту от микробной контаминации и продуктов окислительного стресса. Наибольший интерес в последнее время вызывал белок серицин, который предназначен для склеивания волокон фиброина шелка: описано его мощное антибактериальное и антиоксидантное действие [255, 256]. Антиоксидантные эффекты содержимого куколок дубового шелкопряда связывали до сих пор с действием цекропинов В и D и фенолов [257, 258]. Однако вопрос об антиоксидантной роли содержимого куколок дубового шелкопряда остался пока открытым. Поэтому целью этой главы явилось исследование механизмов действия гемолимфы и ее фракций на процессы свободнорадикального окисления и сопряженные с ним процессы на клеточном уровне.

### **4.1 Антиоксидантная активность гемолимфы куколок и окислительный стресс**

На первом этапе исследований были использованы зрелые эритроциты человека, функционирование которых связано, прежде всего, с состоянием плазматической мембраны и содержанием восстановленного глутатиона. Для получения эритроцитов венозную гепаринизированную кровь трижды центрифугировали с физиологическим раствором (каждый раз супернатант сливали) в течение 8 минут при скорости 2700 об./мин.

В экспериментах с применением эритроцитов человека регистрировали окисление внутриэритроцитарного восстановленного глутатиона и перекисное окисление мембранных липидов, индуцируемое внесением терт-бутил гидропероксида (tBOOH), в отсутствие и в при-

сутствии различных концентраций гемолимфы. При этом использовали гемолимфу, предварительно разбавленную в 5 раз и стабилизированную фенилтиомочевинной, и свежеизвлеченную из куколки гемолимфу без разведения.

Инкубация эритроцитов с tBOOH привела к образованию продуктов перекисного окисления мембранных липидов и окислению эритроцитарного глутатиона. Внесение предварительно разбавленной гемолимфы эффективно ингибировало окислительные процессы в эритроцитах, уровень образующихся продуктов ПОЛ уменьшался на 55%.

Одновременно гемолимфа предотвращала ферментативное окисление восстановленного глутатиона в глутатионпероксидазной реакции. Уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах, подвергнутых действию окислителя (1 мМ tBOOH) в присутствии гемолимфы, был на 38% выше, чем в ее отсутствие. Еще более выраженным антиоксидантным эффектом обладала гемолимфа шелкопряда, свежеизвлеченная из куколки.

Гемолимфа более чем на 65% ингибировала процесс генерирования продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах в присутствии 2 мМ tBOOH (рисунок 4.1). Известно, что индуцируемое органическим пероксидом окислительное повреждение эритроцитов связано с генерацией алкоксильного и пероксильного радикалов в реакции окислителя с оксигемоглобином.

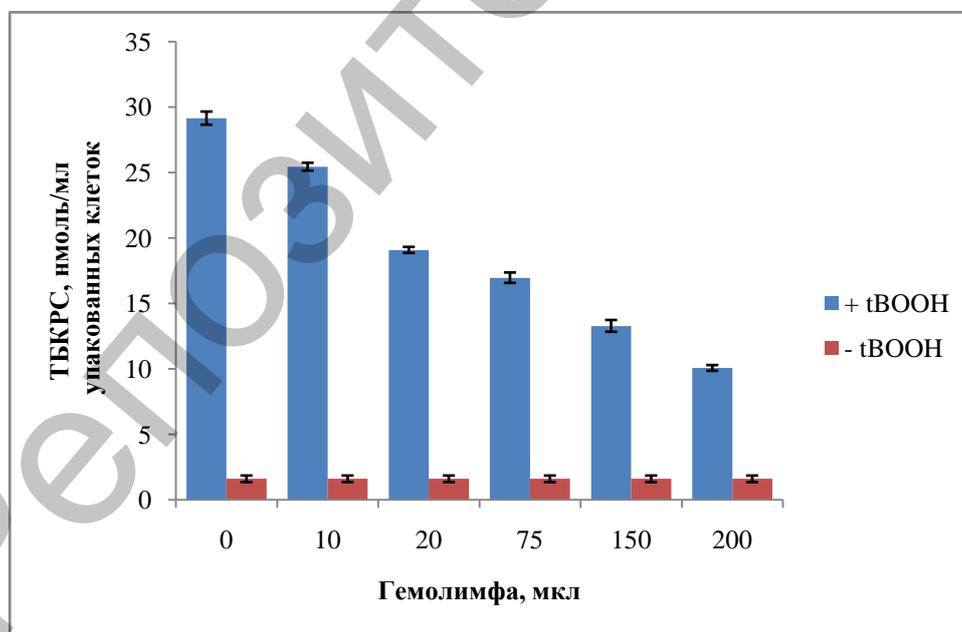


Рисунок 4.1 – Действие гемолимфы куколок шелкопряда на процесс ПОЛ в эритроцитах человека в отсутствие tBOOH и в присутствии 2 мМ tBOOH (2) [2–А]

Можно предположить, что компоненты гемолимфы непосредственно взаимодействуют с образующимися радикалами либо ингибируют процессы их образования. Защитные эффекты проявляются как на уровне мембран, так и внутриклеточных метаболических путей, в частности, сопряженных с поддержанием внутриклеточной концентрации глутатиона. В связи с этим на следующем этапе работы была сделана попытка выяснить, могут ли компоненты гемолимфы влиять на количество делений клеток в условиях их инкубации в присутствии кислорода.

#### **4.2 Влияние аминокислотного состава фракций гемолимфы на количество делений мезенхимальных стволовых клеток**

Было изучено влияние содержащих аминокислоты фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда в разведениях 1:10 и 1:100 на пролиферацию и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы. Ожидалось, что при выраженном стимулирующем либо ингибирующем пролиферацию МСК действии фракций гемолимфы будут отмечены: 1) различия в среднем количестве циклов деления (индикатор количества циклов деления – «ступенчатое» разделение клеток на субпопуляции по степени окрашенности CFSE: меньшее количество красителя соответствует большему количеству делений); 2) различия по жизнеспособности; 3) различия по общему количеству клеток; 4) различия будут дозозависимыми, т.е. более выражены в образцах, инкубированных с фракциями в разведении 1:10, чем 1:100.

Однако четкого разделения клеток по степени окрашенности CFSE в соответствии с количеством циклов деления обнаружить не удалось (из-за разнообразия размеров клеток). Выявленное деление клеток на 2 четкие популяции по окрашенности CFSE отражает скорее жизнеспособность клеток: в более яркую область группируются некротические и апоптотические клетки, в менее яркую – жизнеспособные. Часть яркоокрашенных клеток по соотношению прямого и бокового рассеяния относятся к популяции жизнеспособных клеток (возможно, представляют ранние стадии апоптоза; мелкий размер этих клеток заставляет исключить предположение, что они характеризуют неделящуюся часть основной жизнеспособной популяции). Доля этих клеток представлена на рисунке 4.2, из которого видно, что четких отличий от контроля и выраженной дозовой зависимости процента яркоокрашенных клеток от количества гемолимфы в культуре не наблюдается.

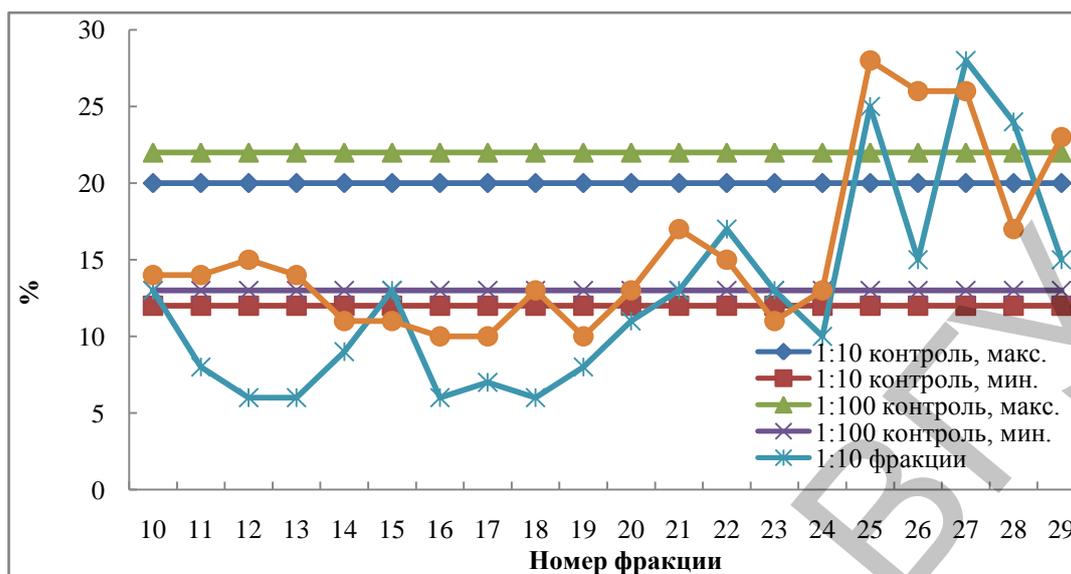


Рисунок 4.2 – Яркокрасящая CFSE популяция МСК в образцах, процент от жизнеспособных окрашенных CFSE клеток

Имеется существенное различие в соотношении клеток, обработанных фракциями 10–24 и 24–29. По всей видимости, в заключительных порциях содержащих аминокислоты фракций гемолимфы (с 25-й по 28-ю) имеются факторы проапоптогенного действия, которые не содержатся во фракциях высокомолекулярных пептидов и белков (с 10-й по 24-ю). Не случайно именно в этих фракциях выявлены восстановленный глутатион и мочевая кислота, обладающие антиоксидантными эффектами.

Жизнеспособность МСК в большинстве образцов, инкубированных с фракциями гемолимфы, была ниже, чем в контроле, однако снижение не было дозозависимым (рисунок 4.3).

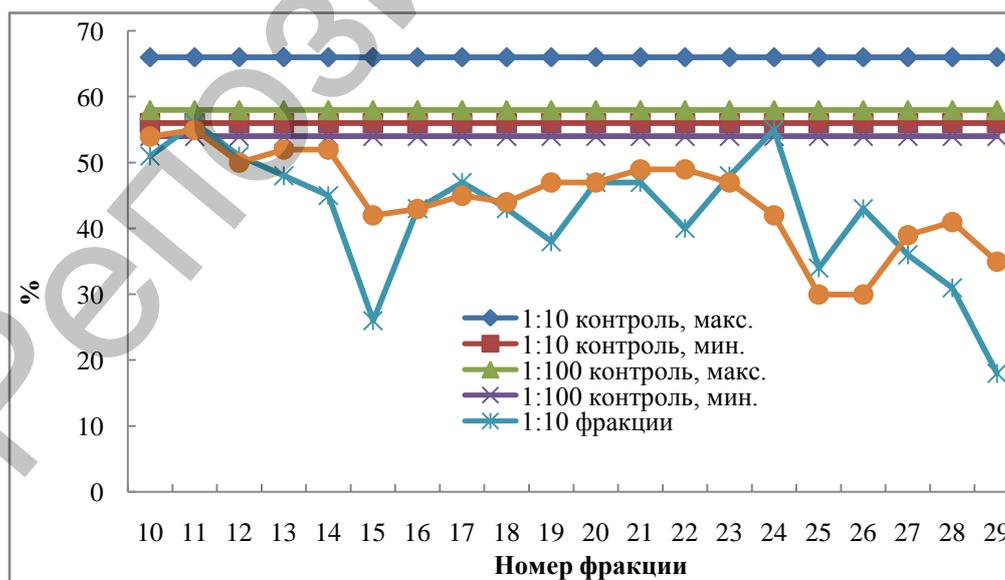


Рисунок 4.3 – Жизнеспособность МСК в образцах, процент от общего числа окрашенных CFSE клеток

Таблица 4.1 – Содержание аминокислот во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда (мкмоль/л)

Номер фракции	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Элюционный объем, мл	<b>64,6</b>	<b>68,4</b>	<b>72,2</b>	<b>76</b>	<b>79,8</b>	<b>83,6</b>	<b>87,4</b>	<b>91,2</b>	<b>95</b>	<b>98,8</b>	<b>102,6</b>	<b>106,4</b>	<b>110,2</b>	<b>114</b>
Asp	3,23	11,6	5,76	10,6	8,09	3,27	7,37	1,97	3,21	1,96	9,41	4,98	3,35	3,14
Glu	38,3	26,4	54,7	331	116	6,10	14,9	2,35	5,22	1,70	14,1	7,93	3,70	4,44
Asn	3,23	1,87	29,4	35,4	28,5	3,34	1,98	0,59	0,25	0,20	1,25	0,57	0,54	0,43
Ser	45,9	9,51	570	1505	1171	260	35,2	7,28	6,19	3,25	12,2	5,98	5,54	4,04
Gln	0,30	1,61	0,96	91,9	362	0,59	12,9	2,23	1,48	0,55	0,87	1,03	1,27	1,43
His	3,21	1,59	6,59	155	1011	2294	931	253	35,2	6,45	2,35	1,00	1,10	0,99
Gly	30,1	9,78	349	1222	1101	305	53,5	11,7	8,24	5,01	26,1	9,36	8,73	6,07
PEA	148	17,7	114	28,2	8,11	1,30	4,50	0,90	4,61	0,70	21,0	2,26	2,81	1,38
Thr	106	12,1	598	853	416	69,5	9,35	2,49	2,96	0,99	5,39	2,00	1,81	1,17
Ctr	3,04	1,18	5,00	143	12,7	13,0	0,72	0,16	0,58	0,26	0,67	0,25	0,32	0,17
Arg	1103	457	331	209	373	95,0	15,9	2,86	7,09	0,70	2,78	0,98	1,24	0,73
bAla	23,0	8,96	123	148	55,2	12,7	1,13	0,43	0,52	0,34	0,43	0,27	0,27	0,16
Ala	58,2	6,48	762	907	321	16,4	11,3	3,13	5,74	2,07	12,7	4,66	4,67	3,10
Tau	2,20	7,99	5,88	8,16	5,39	2,60	8,28	2,13	8,18	2,07	30,1	8,92	5,29	4,00
Tyr	0,05	0,49	0,41	0,61	10,5	24,8	9,92	7,67	29,8	31,9	14,8	4,82	1,06	0,33
Val	153	6,08	621	508	162	11,5	5,15	2,56	3,20	1,51	5,87	2,17	2,35	1,79
Met	7,71	1,06	3,56	44,8	66,3	23,6	2,48	0,14	0,14	0,16	0,17	0,17	0,15	0,13
Ctn	139	22,9	505	1302	207	36,5	18,6	9,48	12,6	6,47	22,5	0,46	5,69	31,0
Trp	0,04	0,14	0,19	0,06	0,15	0,66	1,42	0,68	0,22	0,16	0,13	0,12	0,12	0,10
Ile	0,11	0,35	307	368	142	2,99	1,26	0,49	0,83	0,41	1,69	0,71	0,94	0,57
Phe	42,3	1,22	1,35	1,57	0,99	23,7	93,8	134	52,4	14,2	2,44	0,62	0,49	0,40
Leu	21,1	1,52	238	343	243	1,78	1,22	0,50	0,72	0,48	1,69	0,70	0,82	0,76
HPro	4,23	0,87	6,59	11,0	4,08	1,41	1,46	2,05	1,73	1,60	1,49	2,10	1,40	0,82
Orn	58,0	25,1	143	86,0	22,3	20,5	25,3	25,7	21,5	16,1	22,0	19,2	16,6	16,6
Lys	1859	368	1071	219	41,9	8,78	7,38	8,25	9,15	3,02	6,53	2,82	3,28	4,12
Pro	125	21,0	689	520	142	23,3	20,0	27,4	15,0	22,4	32,9	26,8	19,1	19,4
Сумма	3992	1034	6606	9119	6049	3267	1303	510	239	125	258	121	94	110

Следует обратить внимание на два факта: 1) гемолимфа в разведении 1:10 фракций 15 и 25 оказывает противоположное действие на жизнеспособность МСК; 2) количество жизнеспособных клеток МСК существенно уменьшается после добавления заключительных порций пептидной фракции гемолимфы (фракции 25–28), в которых, возможно, имеются факторы проапоптогенного действия.

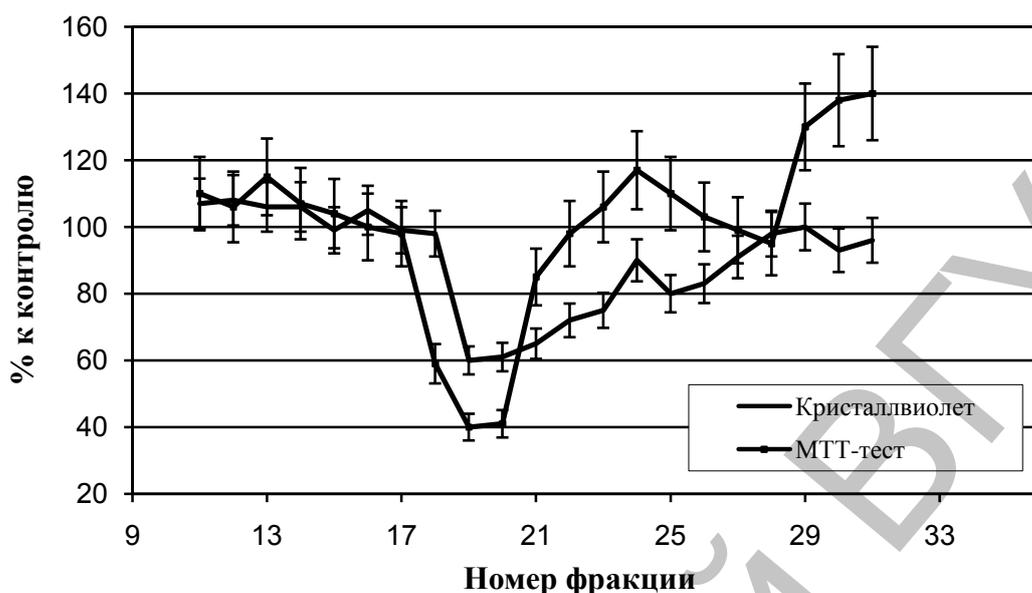
Общее количество клеток (учтенное в одинаковых объемах) в образцах, инкубированных с фракциями гемолимфы, было меньше, чем в контроле, но дозовой зависимости от содержания гемолимфы не выявлено. Полученные результаты позволяют предположить то, что во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда содержатся факторы, подавляющие жизнедеятельность стволовых клеток.

Для объяснения полученных результатов был проанализирован аминокислотный состав фракций гемолимфы (таблица 4.1).

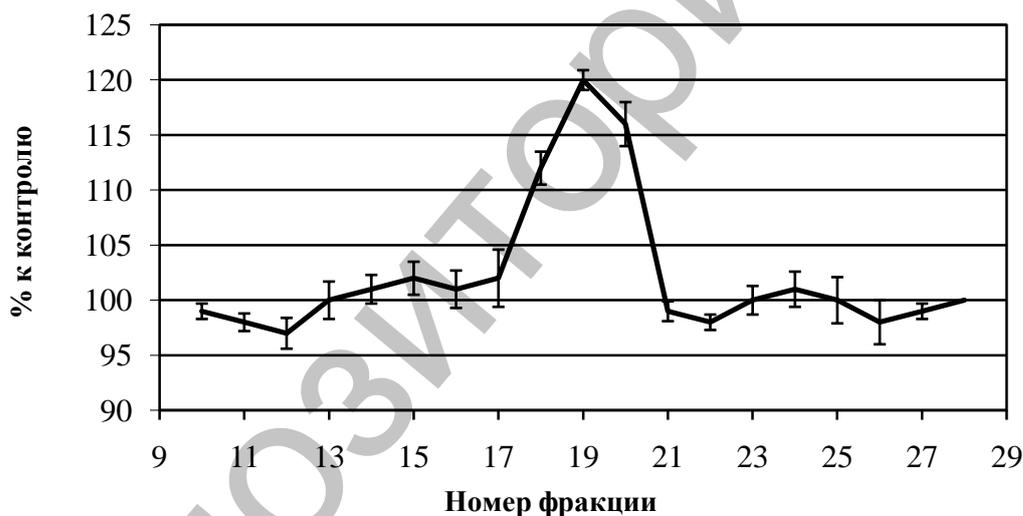
Оказалось, что во фракциях 17–23 среднее содержание аминокислот составляет 4480 мкмоль/л, во фракциях 24–29 их содержание в 20 раз меньше (224 мкмоль/л). Вероятно, это различие и явилось причиной увеличения количества яркоокрашенных CFSE клеток, т.е. клеток, прошедших меньшее количество делений и менее жизнеспособных. Во фракциях, где обнаружены яркоокрашенные клетки, найдено некоторое увеличение содержания тирозина и фенилаланина. Ранее было указано, что эти аминокислоты могут участвовать в регуляции апоптоза.

#### **4.3 Разделение ингибирующей и активирующей синтез ДНК активностей в гемолимфе куколок**

В экспериментах была использована гемолимфа куколок дубового шелкопряда, разделенная на три группы веществ с помощью гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-25 fine: белки и нуклеиновые кислоты, пептиды-аминокислоты и низкомолекулярные биорегуляторы. Исследовались цитотоксичность (МТТ-тест) и влияние каждой фракции на синтез ДНК (включение меченного тимидина в ДНК культивируемых клеток Нер G2). Вначале было изучено цитотоксическое действие фракций гемолимфы на рост трансформированных клеток. Наиболее убедительные результаты получили при изучении влияния фракций гемолимфы, содержащих аминокислоты и пептиды, на рост клеток гепатомы Нер G2: фракции 18–21 подавляли рост клеток. Этот эффект был выявлен как при использовании МТТ-теста, так и окраски кристаллвиолетом (рисунок 4.4).



**Рисунок 4.4 – Рост клеток Нер G2 через 48 ч после инкубации с фракциями ГКДШ, содержащими аминокислоты и пептиды**



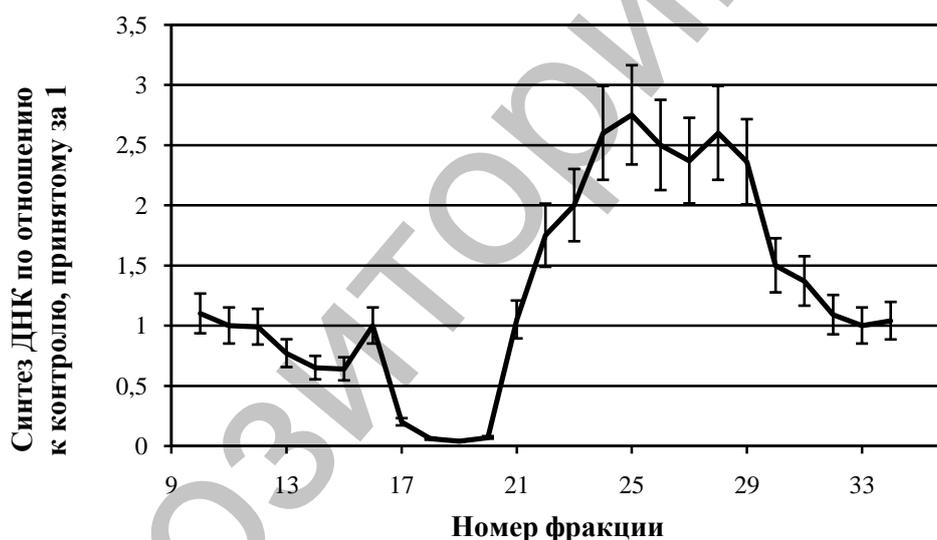
**Рисунок 4.5 – Рост клеток нормальных фибробластов человека через 72 ч после инкубации с фракциями ГКДШ, содержащими аминокислоты и пептиды**

После ингибирующего действия фракций 18–22 наступает в той или иной степени выраженности активирующее действие компонентов последующих фракций зоны аминокислот и пептидов гемолимфы. Таким образом, в присутствии фракций гемолимфы, содержащих аминокислоты и пептиды, обнаружены активирующее и ингибирующее влияния на рост трансформированных клеток.

Для сравнения было исследовано влияние фракций гемолимфы, содержащих свободные аминокислоты и пептиды, на рост фибробластов

нормальной кожи человека (рисунок 4.5). Оказалось, что фракции гемолимфы не тормозили рост клеток фибробластов. В противоположность действию большинства исследованных культур трансформированных клеток рост фибробластов усиливался компонентами фракций 18–20.

Для объяснения природы выявленных эффектов компонентов гемолимфы на рост культивируемых клеток проведено исследование особенностей биосинтеза белков и ДНК в них (рисунок 4.6). Анализ данного рисунка позволяет утверждать, что впервые удалось разделить ингибирующую практически до 0 (фракции 17–20) и активирующую на 285% активности во фракциях 22–28 гемолимфы. Вероятно, ингибирующая активность служит для сохранения состояния диапаузы, а активирующая – включает метаморфоз и формирование тканей бабочки. На различных объектах показано, что ростостимулирующие эффекты проявляются при разведении жидкого содержимого куколок в 10000 раз. Полученные фундаментальные данные объясняют механизм жизненного цикла насекомого на стадии куколки с последовательностью процессов гистолиза и гистогенеза.



**Рисунок 4.6 – Синтез ДНК в клетках Hep G2 через 48 ч после инкубации с фракциями ГКДШ, содержащими аминокислоты и пептиды**

Анализ таблицы 4.1 показал, что цитотоксический и подавляющий биосинтез ДНК эффекты фракций гемолимфы в клетках гепатомы Hep G2 оказывают фракции гемолимфы, содержащие повышенные количества глутаминовой кислоты, аспарагина, серина, глицина, треонина, цитрулина, бета-аланина, аланина, изолейцина, лейцина, гидроксипролина, лизина и пролина, и эти же аминокислоты обеспечивают стимуляцию деления нормальных фибробластов. Усиленный рост трансформированных клеток сопряжен с относительно повышенным содержанием фенилаланина, тирозина, таурина и цистатио-

нина по отношению к другим азотсодержащим веществам. Эти вещества являются эндогенными антиоксидантами.

Открытие активирующей и ингибирующей активностей в пептидсодержащих фракциях гемолимфы ставит задачу идентификации состава аминокислот и пептидов фракций для их использования в качестве биофармацевтических субстанций при управлении процессами жизнедеятельности эукариотических организмов.

#### 4.4 Антиоксидантная активность фракций гемолимфы куколок

В главе 3 было показано, что в гемолимфе, разделенной методом гель-фильтрации, находятся три группы веществ: макромолекулы (белки и нуклеиновые кислоты), аминокислоты и пептиды и низкомолекулярные биорегуляторы.

Поскольку антиоксидантная активность была констатирована при исследовании цельной гемолимфы, представляло интерес оценить наличие антиоксидантной активности во фракциях гемолимфы. Было проведено исследование антиоксидантной активности фракций ГКДШ. Свойства данных фракций первоначально проанализированы на бесклеточных системах, содержащих пероксидазу хрена или гипохлорит. Данные системы применяются в качестве моделей процессов генерации АФК в нейтрофилах, происходящих с участием миелопероксидазы. Миелопероксидаза аналогично пероксидазе хрена катализирует окисление субстратов с использованием пероксида водорода согласно «классической пероксидазной реакции». Кроме того, миелопероксидаза может катализировать образование гипохлорита и других гипогалогенов. Гипохлорит *OCl* напрямую может окислять люминол, что также сопровождается ХЛ. Установлено, что подобно нативной гемолимфе ее отдельные фракции также ингибируют ХЛ, обусловленную окислением люминола в системе, содержащей ПХ+Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, и в системе, содержащей гипохлорит натрия.

На рисунках 4.7 и 4.8 представлены данные, характеризующие ингибирующее действие различных фракций гемолимфы в системах с ПХ и НОСl при различных объемах добавления исследуемых веществ.

Из рисунка 4.7 видно, что по ингибирующему действию на окисление люминола в системе ПХ + Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> можно выделить 3 пика: 1-й – это фракции с 8 по 11, 2-й – фракции 24–27, 3-й – фракции 46–55. Данные фракции выделяются в отдельные пики и по ингибированию ХЛ в системе с гипохлоритом натрия (рисунок 4.8).

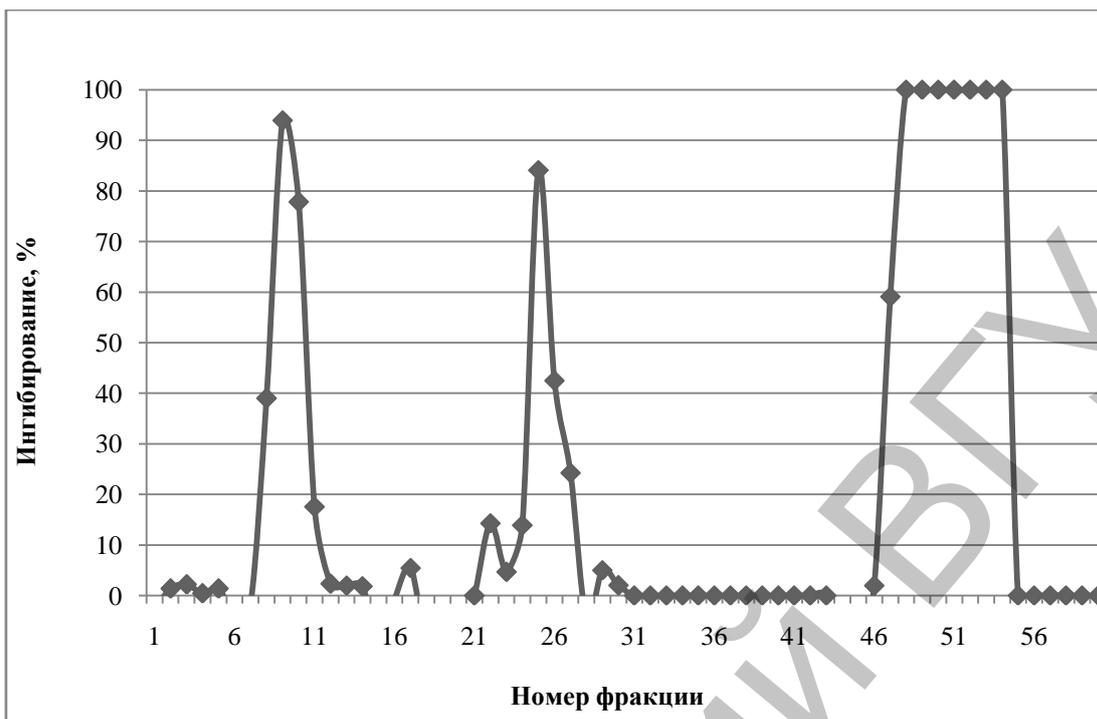


Рисунок 4.7 – Ингибирующее действие отдельных фракций гемолимфы на ХЛ в системе «люминол +  $H_2O_2$  + ПХ»

Таким образом, хроматография на сефадексе G-25 fine позволила определить в гемолимфе, по крайней мере, три отдельные группы веществ, которые способны ингибировать ХЛ, сопровождающую процессы окисления, катализируемые миелопероксидазой. Суммарные данные о влиянии фракций гемолимфы на Люм-ХЛ нейтрофилов при описанных воздействиях представлены на рисунке 4.9.

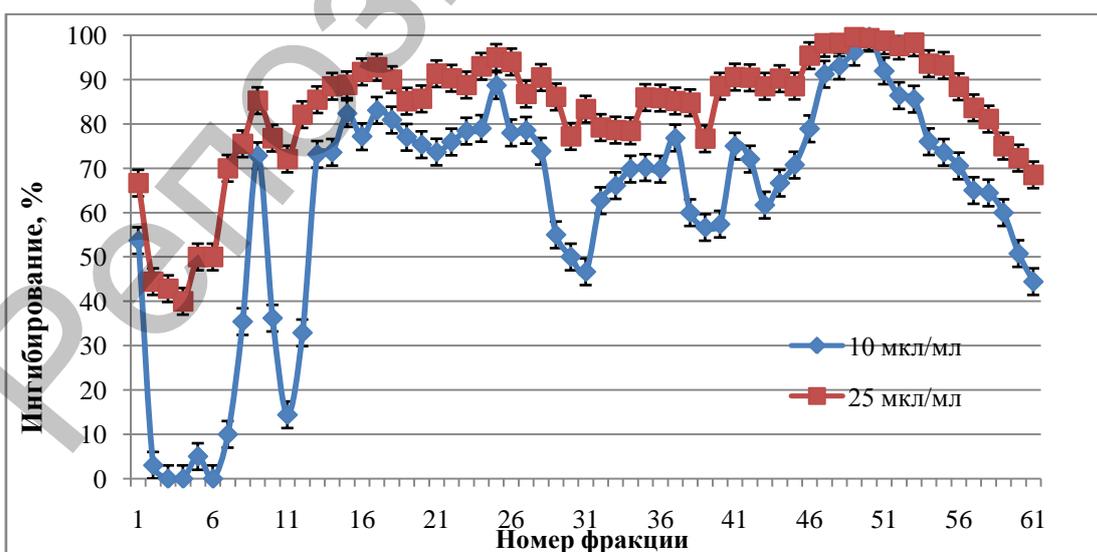
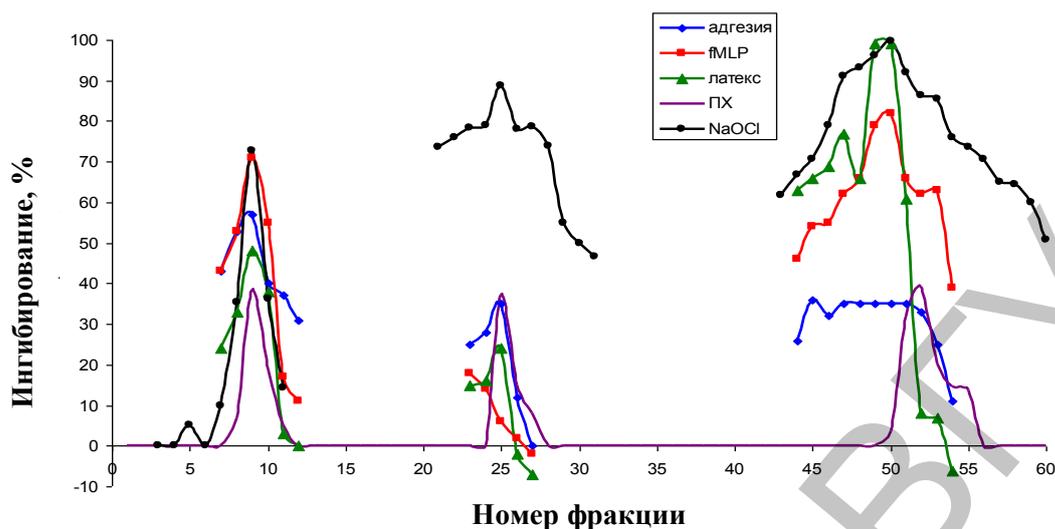


Рисунок 4.8 – Ингибирующее действие отдельных фракций гемолимфы на ХЛ в системе «люминол +  $NaOCl$ »



**Рисунок 4.9 – Ингибирующее действие различных фракций ГКДШ на Люм-ХЛ**

Фракции гемолимфы из 1-го пика (фракции 7–11) ингибировали Люм-ХЛ нейтрофилов, обусловленную генерацией нейтрофилами АФК с участием МПО при всех использованных типах активации. Данные эффекты устойчивы, воспроизводились в отношении клеток различных здоровых доноров, не снижались при хранении образцов при +4°C не менее 6 мес.

Были проведены эксперименты, когда клетки в течение 1 часа инкубировались с фракциями, затем отмывались от несвязанных веществ и только после этого проводились исследования ХЛ нейтрофилов при активирующих воздействиях. Оказалось, что после инкубирования ингибирующий эффект фракций в отношении генерации АФК нейтрофилами при адгезии снижался, а при воздействии латекса и fMLP возрастал. Это свидетельствует о том, что вещества фракций проникают внутрь клеток (по-видимому, путем эндоцитоза) и с удлинением времени контакта с клетками влияние на внутриклеточные системы увеличивается. Такие же эффекты были показаны ранее для гемолимфы. Следует отметить, что эффективность ингибирования у гемолимфы выше, чем у отдельных фракций, по-видимому, вследствие меньшей концентрации действующих веществ во фракциях.

Исследования показали, что фракции 1-го пика (7–11) и гемолимфа куколок наиболее похожи друг на друга по спектральным свойствам (спектрам поглощения в УФ-области и флуоресценции в УФ- и видимой области), их спектры аналогичны спектрам тирозин/триптофан-содержащих пептидов (белков). Действие фракций из 2-го пика (25–27) в отношении генерации АФК нейтрофилами было

наименьшим (по сравнению с фракциями 1-го и 3-го пиков) при всех типах стимуляции и у всех доноров.

Фракции из 3-го пика по-разному влияли на процессы генерации нейтрофилами АФК, их антиоксидантное действие значительно снижалось при длительном хранении образцов (6 месяцев при +4°C). Было также обнаружено, что эффективность ингибирующего действия как нативной гемолимфы, так и ее отдельных фракций в отношении процессов генерации АФК нейтрофилами значительно зависела от количества клеток в образце: с увеличением числа клеток необходимо было также увеличивать объем вносимой фракции для достижения того же эффекта.

Итак, путем анализа фракций гемолимфы, полученных гель-хроматографией на сефадексе G-25 fine, обнаружено три группы веществ, обладающих антиоксидантными свойствами: 1-я – тирозин/триптофан-содержащие высокомолекулярные пептиды, 2-я и 3-я – средне- и низкомолекулярные вещества, не содержащие значительных количеств тирозина и триптофана. Вещества всех трех групп значительно ингибируют окислительные процессы, вызванные действием *ОСГ* и пероксидаз.

Вещества 1-й и 3-й групп ингибируют способность нейтрофилов генерировать АФК. Вещества из 2-й группы проявляют более слабое действие, но именно эта фракция содержит наиболее важные регуляторные аминокислоты и пептиды. Дальнейший поиск активных компонентов, по-видимому, следует проводить во всех трех группах фракций гемолимфы, обладающих антиоксидантной активностью.

## ГЛАВА 5

# ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ ГИСТОЛИЗА НА ТКАНЕВОМ УРОВНЕ

В ходе предварительных этапов исследований установлен химический состав содержимого куколок дубового шелкопряда, формирующийся в процессе гистолиза. Гидрофильные компоненты экстракта куколок дубового шелкопряда, получаемые трехкратной экстракцией при кипячении в соответствии с оригинальным патентом (Республика Беларусь, № 15646), также были исследованы на предмет содержания в них антиоксидантных компонентов. При разделении жидкого содержимого куколок на сефадексе G25 fine получены фракции гемолимфы и изучен их аминокислотный состав. В дальнейших исследованиях выявлено действие гидрофильных компонентов куколок на культуры нормальных и трансформированных клеток, а также изучена их антиоксидантная активность. Было сформулировано понятие «эндогенная антиоксидантная система» гемолимфы куколок, включающая антиоксидантные витамины, аминокислоты, мочевую кислоту, глутатион, белок, подобный липопротеинам высокой плотности, и фенольные соединения. В данной главе монографии исследована эффективность компонентов эндогенной антиоксидантной системы гемолимфы куколок на тканевом уровне. Целью этого этапа являлось испытание биологической активности низкомолекулярных продуктов гистолиза в составе ЭКДШ и фракций гемолимфы, содержащих пептиды и аминокислоты, на клеточных системах тканей печени, селезенки и тимуса крыс, а также простейших моделях окислительного стресса – проращивание семян и *Allium*-тест.

### **5.1 Серосодержащие аминокислоты в тканях крыс после введения экстракта куколок дубового шелкопряда**

Доказано, что пул SH-содержащих соединений, играющих важную роль в эндогенной антиоксидантной системе, в клетках иммунокомпетентных тканей влияет на общее состояние иммунитета [259]. В этой связи повышение продукции тиолов (цистеин, восстановленный глутатион) – отличительная черта иммунного ответа *in vivo*. Низкомолекулярные тиолы содержатся в большом количестве в герминативных центрах тимуса, селезенки и лимфатических узлов [260]. Одновременно показано, что Т-зоны лимфатических узлов содержат как покоящиеся, так и активированные Т-лимфоциты, которые не способны высвободить тиолы. В свою очередь, именно для активированных

В-лимфоцитов характерен синтез соединений, содержащих свободные SH-группы [261, 262]. Роль свободных аминокислот в функционировании иммунной системы заключается в активации Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных киллеров и макрофагов; сохранении клеточного редокс-потенциала, экспрессии генов и пролиферации лимфоцитов; продукции антител, цитокинов и других цитотоксических соединений [202, 263–265]. Метионин является аминокислотой, которая инициирует синтез пептидов и белков, а также метилирование нуклеиновых кислот. Метаболиты метионина принимают самое активное участие в регуляции ключевых реакций в иммунокомпетентных клетках. Так, повышенное образование гомоцистеина оказывает негативное влияние на иммунную функцию. Показано, что недостаточность фолиевой кислоты и В<sub>12</sub>, способствующая накоплению гомоцистеина, сопровождается снижением иммунитета, апоптозом гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге и появлением лейкоцитов с гипометилированной ДНК в периферической циркуляции. Гомоцистеин дозозависимым образом активирует Т-клетки, запуская процессы апоптоза. Доказана связь между накоплением этой аминокислоты и развитием окислительного стресса [266–269]. Образование цистеинсульфиновой кислоты определяет процессы фосфорилирования регуляторных белков, поток кальция, рост и пролиферацию нативных CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Показано, что продукция фактора некроза опухоли (ФНО-α) коррелирует с уровнем в лимфоцитах цистеинсульфиновой кислоты, т.е. метаболизм цистеина является важным регуляторным механизмом, модулирующим сигнальную, пролиферативную и иные функции CD8<sup>+</sup> Т-клеток [270]. Таурин – конечный продукт метаболизма метионина и цистеина. Он участвует в процессах клеточной пролиферации и предупреждении чрезмерного окислительного стресса. Показано, что таурин выполняет протекторную функцию в обмене хроматина в лимфоцитах человека. Высокие уровни таурина в клетке защищают от повреждения ДНК и снижают число мутаций [271].

Целью этого этапа работы явилось изучение влияния курсового введения экстракта куколок дубового шелкопряда крысам на уровень серосодержащих аминокислот в лимфоцитах, выделенных из тканей печени, селезенки и тимуса активно растущих животных. Известно, что активация метаболических процессов, сопровождаемая интенсификацией синтеза протеинов, приводит к падению содержания свободных незаменимых аминокислот, в том числе метионина, в клетках [272].

В данном эксперименте внутрижелудочное введение растущим животным ЭКДШ вызывало резкое падение уровня свободного метионина в лимфоцитах, выделенных из ткани печени. Метионинаденозилтрансфераза II (МАТ II) является ключевым ферментом

клеточного метаболизма и катализирует образование S-аденозил-метионина 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 [273, 274].

В лимфоцитах печени снижение уровня метионина после курсового введения ЭКДШ сопровождалось значимым приростом цистеина, поставляющего сульфгидрильные группы и участвующего в синтезе глутатиона и, одновременно, являющегося предшественником таурина. Это способ повышения мощности эндогенной АОС печени. Об активации метаболического пути, утилизирующего гомоцистеин, свидетельствует увеличение количества цистатионина в лимфоцитах (таблица 5.1). 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.

Таблица 5.1 – Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс, выделенных из ткани печени (мкмоль/млн клеток)

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

Примечание – <sup>1</sup> P<0,05.

В то же время в лимфоцитах, выделенных из ткани селезенки, не найдено достоверных изменений уровня метионина (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс, выделенных из ткани селезенки (мкмоль/млн клеток)

<b>Аминокислоты</b>	<b>Контроль</b>	<b>Опыт</b>
Метионин	0,16±0,04	0,23±0,03
Цистатионин	0,18±0,04	0,06±0,01 <sup>1</sup>
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 <sup>1</sup>
Цистеин/таурин	0,29±0,040	0,18±0,022 <sup>1</sup>

Примечание – см. таблицу 5.1.

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.

Выявлены данные об изменениях количества и соотношения серосодержащих аминокислот в лимфоцитах, выделенных из ткани тимуса (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Уровни свободных серосодержащих аминокислот в лимфоцитах крыс, выделенных из ткани тимуса (мкмоль/млн клеток)

<b>Аминокислоты</b>	<b>Контроль</b>	<b>Опыт</b>
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 <sup>1</sup>
Цистатионин/цистеин	0,10±0,012	0,050±0,006 <sup>1</sup>
Цистеин/таурин	0,16±0,014	0,70±0,077 <sup>1</sup>

Примечание – см. таблицу 5.1.

Несмотря на отсутствие достоверных изменений абсолютных количеств определяемых нами соединений, анализ соотношений показывает повышение скорости наработки или поступления в клетки тиолсодержащих соединений со свободной сульфгидрильной группой (цистеин). Известно, что переносчик цистеин/глутамат не активен в покоящихся Т-лимфоцитах, но быстро индуцируется при активации Т-клеток, активно захватывая экзогенный цистеин [259]. Глутатион и цистеин являются важными регуляторами Т-клеточной пролиферации, регуляция которой включает действие интерлейкина-2 (ИЛ-2). Напротив, истощение в лимфоцитах запасов глутатиона характерно для ранних стадий апоптоза. В этих ситуациях отток глутатиона из лимфоцитов осуществляется через специфический глутатионовый переносчик [275]. 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 [265]. 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 [262, 267].

Несмотря на отсутствие выраженного увеличения в клетках количества таурина, тем не менее, очевидно повышение его содержания относительно некоторых других серосодержащих аминокислот. Помимо регуляции объема клеток и некоторых других функций таурин активно связывает образующуюся в иммунокомпетентных клетках гипохлорную кислоту. Таурохлорамин, в свою очередь, оказывает разнообразные клеточные эффекты: от торможения продукции провоспалительных медиаторов до ингибирования клеточной пролиферации и индукции апоптоза. Полагают, что таурохлорамин способен активировать апоптоз, воздействуя на продукцию цитокинов и активацию каспаз [276–278]. Доказано, что наличие таурохлорамина приводит к быстрому торможению пролиферации с последующей стимуляцией продукции белков семейства Bcl-2 и активацией соответствующих каспаз [279].

Поскольку лимфоцит является функциональной и морфологической единицей иммунной системы, мигрирующей между различными органами и контактирующей с орган-специфическими клетками, он способен в определенной степени отражать происходящие в них изменения. При активации лимфоцитов наблюдается обратимое усиление основных метаболических процессов, что может являться дополнительным диагностическим критерием, используемым для определения степени активности иммунной составляющей патологического процесса, эффективности лекарственной терапии и прогноза. Доказано, что дополнительное введение в организм животных свободных сульфгидрильных групп инактивирует антитела класса IgM независимо от специфичности, восстанавливая их дисульфидные внутримолекулярные связи.

Выявленные различия между лимфоцитами печени, селезенки и тимуса в содержании некоторых низкомолекулярных тиолов могут быть обусловлены тем, что в популяции лимфоцитов печени 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 [280].

Таким образом, курсовое введение ЭКДШ растущим животным изменяет пул низкомолекулярных тиолсодержащих соединений в лимфоцитах. Изменения содержания метионина и его метаболитов в клетках иммунной системы имеют орган-специфические особенности, что подтверждает важное значение микроокружения (homing-эффекта) в модуляции функций иммунокомпетентных клеток и формировании эндогенной антиоксидантной системы.

## 5.2 Влияние экстракта куколок дубового шелкопряда на стресс, воспроизводимый в растительных тест-системах

Известно, что природные регуляторы роста, содержащие комплекс аминокислот и биологически активных веществ, применяются в низких концентрациях, нетоксичны для растений и окружающей среды, повышают антистрессовые способности растений [281]. Поэтому в качестве контроля действия ЭКДШ использовали оксидат торфа (ОТ), который является природным гидролизатом, содержащим гуминовые и фульвовые кислоты (68% и 15% соответственно), 16 аминокислот, нафтеновую кислоту, фенолы, хиноны, белковые вещества (9,3–11,8%), углеводы (6–8,2%), макро- и микроэлементы. Для выяснения влияния ЭКДШ и оксидата торфа в различных разведениях (от 1:10 до 1:10<sup>6</sup>) было проведено их тестирование с использованием ячменя обыкновенного и лука репчатого (таблицы 5.4–5.5). Биохимические показатели определяли в листьях растений.

Таблица 5.4 – Действие ЭКДШ и ОТ в тесте стресса прорастания ячменя

Препараты	Группы	Длина корней, мм	Активность ГР, мкмоль/мин·г ткани	Активность КТ, мкмоль/мин·г ткани	ТБКРС, мкмоль/мин·г ткани
	ЭКДШ	Контроль	123,8±2,90	6,1±0,12	9,7±0,44
1:10		134,0±3,67 <sup>1</sup>	5,3±0,36	6,2±0,56 <sup>1</sup>	2,5±0,19
1:10 <sup>2</sup>		128,8±3,19	6,0±0,14	5,3±0,40 <sup>1</sup>	2,6±0,28
1:10 <sup>3</sup>		124,6±4,12	6,0±0,15	5,8±0,53 <sup>1</sup>	2,3±0,26
1:10 <sup>4</sup>		151,9±2,11 <sup>1</sup>	6,1±0,13	3,6±0,18 <sup>1</sup>	1,7±0,07 <sup>1</sup>
1:10 <sup>5</sup>		136,0±2,4 <sup>1</sup>	5,7±0,31	4,8±0,26 <sup>1</sup>	1,9±0,09 <sup>1</sup>
1:10 <sup>6</sup>		129,9±4,06	6,3±0,16	4,1±0,83 <sup>1</sup>	2,3±0,19
Оксидат торфа	1:10	119,2±5,36	5,5±0,41	5,1±0,71 <sup>1</sup>	2,7±0,14
	1:10 <sup>2</sup>	115,1±4,52	5,7±0,26	7,6±0,38 <sup>1</sup>	2,6±0,25
	1:10 <sup>3</sup>	128,6±4,4	6,2±0,51	7,3±0,52 <sup>1</sup>	2,9±0,18
	1:10 <sup>4</sup>	146,4±3,22 <sup>1</sup>	5,9±0,19	4,7±0,11 <sup>1</sup>	2,0±0,11 <sup>1</sup>
	1:10 <sup>5</sup>	136,5±3,60 <sup>1</sup>	6,2±0,08	3,7±0,49 <sup>1</sup>	2,5±0,29
	1:10 <sup>6</sup>	135,0±3,46 <sup>1</sup>	6,2±0,05	7,5±0,77 <sup>1</sup>	2,9±0,26

Примечание – см. таблицу 5.1.

Показано, что для роста и развития ячменя наиболее эффективными разведениями экстракта куколок шелкопряда и оксидата торфа являются 1:10<sup>4</sup> – 1:10<sup>5</sup>. При этих разведениях статистически значимо увеличивается длина корней ячменя, снижаются активность каталазы и содержание ТБК-реагирующих соединений (таблица 5.4).

Действие высоких разведений экстракта куколок ( $1:10^4 - 1:10^5$ ) эффективнее, чем действие оксидата торфа, по влиянию на содержание в зеленых листьях хлорофиллов  $a+b$  в *Allium*-тесте (таблица 5.5). Обработка луковиц ЭКДШ в разведении  $1:10$  и  $1:10^2$  способствует уменьшению содержания  $\alpha$ -аминного азота. В разведениях  $1:10$  и  $1:10^2$  ЭКДШ уменьшает суммарное содержание хлорофиллов  $a+b$ , но увеличивает содержание каротиноидов, а в разведениях  $1:10^4$  и  $1:10^5$  – увеличивает содержание суммы хлорофиллов  $a+b$  на фоне нормального содержания каротиноидов. Оксидат торфа в больших разведениях уменьшает содержание суммы хлорофиллов ( $1:10^3$ ,  $1:10^5$ ,  $1:10^6$ ) и содержание каротиноидов ( $1:10^6$ ). Эти данные доказывают преимущества препарата ВЭКШ над оксидатом торфа в действии на фотосинтетический аппарат листьев лука. В зеленых листьях основная доля пигментов приходится на  $\beta$ -каротин и ксантофиллы (лютеин, неоксантин, виолаксантин и зеаксантин). Основные функции каротиноидов – фотозащитная, светособирающая, структурная, а также участие в фотохимических процессах ФС I и II, – хорошо изучены и могут меняться при стрессовых воздействиях на растения. Поэтому эти показатели могут являться критериями окислительного стресса на растительных тест-системах [141, 282–284].

Положительные эффекты применяемых биологически активных композиций возникают при высоких разведениях. Возможно, что в гидролизатах торфа и содержимого куколок шелкопряда содержатся субстанции ингибирующего и активирующего действия, как это было показано для фракций гемолимфы куколок, причем ингибирующие эффекты исчезают в разведениях, превышающих диапазон  $1:10^4 - 1:10^5$ . Полученные положительные эффекты при высоких разведениях согласуются с исследованиями действия сверхмалых доз препаратов [285–287].

В результате воздействия неблагоприятных температур у растений происходят торможение фотосинтеза, усиление дыхания, повышение содержания свободных радикалов, а также повышение проницаемости мембран, активация синтеза стрессовых белков [288–293]. Поэтому в дальнейших исследованиях к стрессу прорастания был добавлен температурный стресс. Под влиянием низкотемпературного стресса в листьях ячменя статистически значимо увеличивается активность антиоксидантного фермента каталазы на 49,5%, а также усиливается накопление ТБКРС на 56%. Предварительная обработка семян растворами ОТ и ЭКДШ обеспечила уменьшение количества ТБКРС во всех опытных группах, но предотвращение повышения активности КТ достигнуто было только при использовании ЭКДШ.

Таблица 5.5 – Показатели *A. сера* при действии разных разведений биологически активных субстанций

Обработка	Группы	Длина корней, мм	Сумма хлоро- филлов <i>a + b</i> , мг/л	Каротиноиды, мг/л	$\alpha$ -аминный азот, мг/г ткани	ДК, мкМоль/г ткани	ТБКРС, мкМоль/г ткани
	<b>Контроль</b>	<b>18,2±1,5</b>	<b>11,69±0,324</b>	<b>2,33±0,157</b>	<b>8,61±0,140</b>	<b>0,42±0,0153</b>	<b>3,1±0,44</b>
<b>ЭКДШ</b>	1:10	23,3±4,54 <sup>1</sup>	9,80±0,305 <sup>1</sup>	2,72±0,136 <sup>1</sup>	7,60±0,196 <sup>1</sup>	0,37±0,018	2,3±0,47
	1:10 <sup>2</sup>	25,4±5,86 <sup>1</sup>	8,43±0,226 <sup>1</sup>	3,49±0,319 <sup>1</sup>	7,86±0,275	0,35±0,015	3,2±0,19
	1:10 <sup>3</sup>	21,8±4,60 <sup>1</sup>	11,76±0,230	2,44±0,127	7,88±0,445	0,42±0,050	3,6±0,60
	1:10 <sup>4</sup>	27,6±6,90 <sup>1</sup>	15,76±0,630 <sup>1</sup>	2,37±0,134	10,3±0,57 <sup>1</sup>	0,30±0,027 <sup>1</sup>	3,1±0,40
	1:10 <sup>5</sup>	20,6±6,58	13,12±0,344 <sup>1</sup>	2,45±0,093	9,76±0,268 <sup>1</sup>	0,31±0,042 <sup>1</sup>	4,1±0,49
	1:10 <sup>6</sup>	20,3±4,29	10,45±0,621	2,35±0,13	7,36±0,166 <sup>1</sup>	0,41±0,026	2,4±0,11
<b>Оксидаг торфа</b>	1:10	23,6±6,07 <sup>1</sup>	10,29±1,098	2,64±0,249	7,48±0,308 <sup>1</sup>	0,57±0,089	4,1±0,65
	1:10 <sup>2</sup>	20,6±5,03	9,41±1,669	2,41±0,374	8,73±0,307	0,56±0,068	3,2±0,21
	1:10 <sup>3</sup>	19,4±5,92	8,96±0,605 <sup>1</sup>	2,44±0,065	10,1±0,53 <sup>1</sup>	0,63±0,084 <sup>1</sup>	2,7±0,25
	1:10 <sup>4</sup>	18,9±3,99	9,24±1,393	2,16±0,299	9,70±0,390 <sup>1</sup>	0,41±0,019	3,5±0,22
	1:10 <sup>5</sup>	21,6±7,06	8,68±0,825 <sup>1</sup>	2,47±0,231	10,8±0,80 <sup>1</sup>	0,64±0,029 <sup>1</sup>	3,6±0,64
	1:10 <sup>6</sup>	19,9±3,14	6,42±0,751 <sup>1</sup>	1,85±0,134 <sup>1</sup>	8,53±0,234	0,42±0,016	4,9±1,01

Примечание – см. таблицу 5.1.

К настоящему времени доказано наличие фитотоксического эффекта тяжелых металлов [294–304]. Поэтому было изучено влияние солей тяжелых металлов в присутствии природного антиоксиданта ЭКДШ на длину корней и биохимические показатели лука репчатого. Установлено, что обработка луковиц растворами  $\text{CuSO}_4$  приводила к развитию состояния длительного окислительного стресса, что подтверждалось повышенными концентрациями ТБКРС и ДК в листьях лука на 9-е сутки после действия солей ТМ (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Влияние ЭКДШ на длину корней и содержание ТБКРС и ДК в листьях *A. сера* при действии  $\text{CuSO}_4$

Экспериментальная группа	ТБКРС, мкмоль/г	ДК, мкмоль/г	Длина корней, мм
Контроль	2,44±0,023	0,18±0,009	12,0±0,55
$\text{CuSO}_4$ , 12,5 мг/л	3,11±0,019 <sup>1</sup>	0,34±0,019 <sup>1</sup>	5,4±0,44 <sup>1</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 12,5 мг/л + ЭКДШ	2,22±0,014 <sup>1,2</sup>	0,29±0,008 <sup>1,2</sup>	11,0±0,9 <sup>2</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 2,5 мг/л	3,73±0,029 <sup>1</sup>	0,32±0,029 <sup>1</sup>	7,3±0,54 <sup>1</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 2,5 мг/л + ЭКДШ	2,42±0,012 <sup>2</sup>	0,20±0,005 <sup>2</sup>	12,3±0,77 <sup>2</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 1,25 мг/л	3,22±0,026 <sup>1</sup>	0,22±0,013 <sup>1</sup>	9,5±0,92 <sup>1</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 1,25 мг/л + ЭКДШ	2,49±0,012 <sup>2</sup>	0,18±0,016	12,9±0,91 <sup>2</sup>

Примечание – <sup>1</sup>  $P < 0,05$  по сравнению с контролем, <sup>2</sup>  $P < 0,05$  по сравнению с действием соли без ЭКДШ.

Поскольку четкой зависимости содержания ТБКРС и ДК от концентрации  $\text{CuSO}_4$  не было выявлено, можно полагать, что на этом сроке наблюдения регистрируется факт запуска процессов перекисного окисления липидов растворами сульфата меди. Однако при исследовании длины корней выявляется обратная корреляционная зависимость между концентрацией соли ( $\text{CuSO}_4$ ) и длиной корешков лука ( $r=0,89$ ,  $P < 0,05$ ). Следовательно, можно сделать заключение о том, что степень подавления роста корней зависит от концентрации  $\text{CuSO}_4$ . При обработке луковиц смесью растворов  $\text{CuSO}_4$  и ЭКДШ через 9 суток не обнаружены изменения ТБКРС и ДК, характерные для действия только растворов соли (за исключением уровня ДК при концентрации  $\text{CuSO}_4$  12,5 мг/л). Поэтому компоненты ЭКДШ либо уменьшали выраженность перекисного окисления липидов, либо сокращали сроки действия процессов окислительного стресса. Это предположение подтверждается данными о длине корней – через 9 дней после их обработки смесью растворов  $\text{CuSO}_4$  и ЭКДШ длина корней во всех вариантах опыта не отличалась от контрольных величин и была достоверно выше, чем у луковиц, обработанных только растворами  $\text{CuSO}_4$ .

При действии на луковицы растворов  $Pb(NO_3)_2$  через 9 суток также зарегистрированы проявления окислительного стресса (таблица 5.7).

Таблица 5.7 – Влияние ВЭКШ на длину корней и содержание ТБКРС и ДК в листьях *A. сера* при действии  $Pb(NO_3)_2$

Экспериментальная группа	ТБКРС, мкмоль/г	ДК, мкмоль/г	Длина корней, мм
Контроль	2,44±0,023	0,18±0,009	12,0±0,55
$Pb(NO_3)_2$ , 331 мг/л	2,58±0,029 <sup>1</sup>	0,85±0,058 <sup>1</sup>	6,6±1,06 <sup>1</sup>
$Pb(NO_3)_2$ , 331 мг/л + ЭКДШ	1,78±0,009 <sup>1,2</sup>	0,42±0,002 <sup>1,2</sup>	8,8±1,07 <sup>1</sup>
$Pb(NO_3)_2$ , 33,1 мг/л	3,12±0,019 <sup>1</sup>	0,49±0,108 <sup>1</sup>	7,0±0,87 <sup>1</sup>
$Pb(NO_3)_2$ , 33,1 мг/л + ЭКДШ	2,11±0,031 <sup>1,2</sup>	0,20±0,011 <sup>2</sup>	10,8±1,01 <sup>2</sup>
$Pb(NO_3)_2$ , 3,31 мг/л	2,23±0,032 <sup>1</sup>	0,33±0,038 <sup>1</sup>	9,9±0,72 <sup>1</sup>
$Pb(NO_3)_2$ , 3,31 мг/л + ЭКДШ	1,69±0,020 <sup>1,2</sup>	0,21±0,014 <sup>2</sup>	12,1±0,9

Примечание – см. таблицу 5.6.

По сравнению с  $CuSO_4$ , после действия растворов  $Pb(NO_3)_2$  в большей степени возрастали уровни ДК. Величины содержания ДК находились в прямой корреляционной зависимости от концентрации  $Pb(NO_3)_2$  в растворах ( $r=0,98$ ,  $p<0,05$ ). Поскольку ДК являются показателем ранних этапов перекисного окисления липидов, можно заключить, что ионы свинца могут инициировать процессы ПОЛ в большей степени, чем ионы меди. Однако содержание ТБКРС было повышенным в листьях лука только после обработки луковиц раствором  $Pb(NO_3)_2$  в концентрации 331 и 33,1 мг/л. При концентрации соли 3,31 мг/л содержание ТБКРС было даже ниже, чем в контроле. Не исключено, что ионы свинца более интенсивно и дозозависимо запускают процессы окислительного стресса, но эндогенные антиоксидантные системы клеток листьев частично препятствуют развитию процесса ПОЛ. Через 9 суток после обработки луковиц  $Pb(NO_3)_2$  в сочетании с ЭКДШ выявлено достоверное уменьшение образования ДК и ТБКРС. Вероятно, компоненты ЭКДШ действуют синергично с эндогенными антиоксидантными системами, препятствующими накоплению ТБКРС. Это предположение подтверждается данными о длине корней. При концентрации  $Pb(NO_3)_2$  331 мг/л не получено достоверного эффекта ВЭКШ на длину корней. Действие нитрата свинца при концентрации 33,1 мг/л и добавлении ЭКДШ привело к статистически значимому удлинению корней до контрольного уровня. При самой низкой концентрации  $Pb(NO_3)_2$  в сочетании с ВЭКШ выявлена полная нормализация длины корней лука.

Для объяснения полученных результатов исследовали активность двух антиоксидантных ферментов. Активность СОД была увеличена в листьях лука через 9 дней после обработки раствором  $CuSO_4$  в концентрации 12,5 мг/л (таблица 5.8). Действие раствора сульфата меди в кон-

центрации 2,5 мг/л также привело к увеличению активности СОД, однако из-за большого разброса данных эти различия оказались недостоверными. Добавление ЭКДШ к растворам  $\text{CuSO}_4$  нормализовало активность СОД через 9 суток после обработки луковиц.

Таблица 5.8 – Влияние ЭКДШ на активность антиоксидантных ферментов в листьях *A. сера* при действии  $\text{CuSO}_4$

Экспериментальная группа	Активность СОД, ммоль/мин·г ткани	Активность ГР, мкмоль/мин·г ткани
Контроль	0,67±0,152	52±2,1
$\text{CuSO}_4$ , 12,5 мг/л	1,19±0,191 <sup>1</sup>	81±4,4 <sup>1</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 12,5 мг/л + ЭКДШ	0,89±0,094	42±1,8 <sup>1,2</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 2,5 мг/л	1,49±0,565	78±2,4 <sup>1</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 2,5 мг/л + ЭКДШ	0,99±0,102	44±2,4 <sup>1,2</sup>
$\text{CuSO}_4$ , 1,25 мг/л	0,75±0,089	56±2,5
$\text{CuSO}_4$ , 1,25 мг/л + ЭКДШ	0,97±0,290	46±2,1 <sup>1,2</sup>

Примечание – см. таблицу 5.6.

Активность ГР была достоверно повышена при действии на луковицы растворов  $\text{CuSO}_4$  с концентрацией 12,5 и 2,5 мг/л. Обработка луковиц смесью растворов  $\text{CuSO}_4$  и ЭКДШ при всех испытанных концентрациях сульфата меди привела к однотипному результату: уменьшению активности ГР в область величин ниже контрольного уровня.

Активность СОД была повышена в листьях лука при действии  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  в концентрациях 331 и 33,1 мг/л (таблица 5.9). Обработка луковиц смесью растворов  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  и ЭКДШ обеспечила сохранение СОД на контрольном уровне. Активность ГР была повышена в листьях лука, обработанного растворами  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  во всех 3-х концентрациях. Добавление ЭКДШ способствовало сохранению активности фермента в области контрольных величин.

Таблица 5.9 – Влияние ЭКДШ на активность антиоксидантных ферментов в листьях *A. сера* при действии  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

Экспериментальная группа	Активность СОД, ммоль/мин·г ткани	Активность ГР, мкмоль/мин·г ткани
Контроль	0,67±0,152	52±2,1
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 331 мг/л	1,18±0,141 <sup>1</sup>	69±1,1 <sup>1</sup>
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 331 мг/л + ЭКДШ	0,89±0,152	63±2,0 <sup>2</sup>
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 33,1 мг/л	1,06±0,105 <sup>1</sup>	69±2,9 <sup>1</sup>
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 33,1 мг/л + ЭКДШ	0,81±0,110	48±5,2 <sup>2</sup>
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 3,31 мг/л	0,96±0,145	80±1,7 <sup>1</sup>
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , 3,31 мг/л + ЭКДШ	0,73±0,185	74±12,5

Примечание – см. таблицу 5.6.

Итак, в результате проведенных исследований получены данные, демонстрирующие протекторные свойства ЭКДШ по отношению к инициации и развитию окислительного стресса у *A. сера*, вызванного обработкой луковиц растворами  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Благодаря этому эффекту через 9 суток после обработки луковиц смесями солей и ЭКДШ не выявлено укорочения длины корней, повышенных уровней ДК и ТБКРС, а также активности исследованных антиоксидантных ферментов в листьях лука. По закономерным изменениям активности ГР в листьях лука можно полагать, что восстановление глутатиона играет важную роль в развитии окислительного стресса у *A. сера*.

Можно предположить следующий механизм защитного эффекта ЭКДШ при окислительном стрессе, вызванном солями ТМ. Ионы меди и свинца всасываются корнями лука, проникают в донце и затем в растущие листья. На протяжении 9 суток происходит около 10 делений клеток, в результате которых внутриклеточная концентрация ТМ постепенно падает, но, вероятно, остается достаточной для инициации свободнорадикальных процессов и противодействующих им эндогенных антиоксидантных систем. При наличии ЭКДШ вместе с ионами ТМ всасываются и экзогенные низкомолекулярные антиоксиданты, которые с самого начала ограничивают инициацию свободнорадикальных процессов, усиливая мощность эндогенных антиоксидантов. В результате через 9 суток проявления окислительного стресса минимальны, а рост корней соответствует контрольным значениям.

В таблице 5.10 представлены данные о содержании хлорофиллов и каротиноидов, являющихся участниками фотосинтеза в растительных клетках. Предположительно обработка луковиц растворами ТМ инициирует долгосрочные реакции по механизмам окислительного стресса. Косвенно такое предположение подтверждается существенным снижением концентрации суммы хлорофиллов в листьях предварительно обработанных растворами солей меди и свинца луковиц. Аналогичного снижения концентрации каротиноидов в листьях на 9-е сутки после обработки луковиц растворами солей меди и свинца выявить не удалось, вероятно, потому что период полужизни этих соединений намного короче, чем у хлорофиллов.

В группе растений, где применяли ЭКДШ (контроль 2), сумма хлорофиллов и количество каротиноидов были достоверно выше. В большинстве групп опыта в листьях предварительно обработанных луковиц растворами солей тяжелых металлов совместно с ЭКДШ был найден соответствующий контролю 1 уровень содержания суммы хлорофиллов и каротиноидов. В результате проведенных исследований выявлено, что однократное действие экстракта куколок дубового шелкопряда (контроль 2) способствует статистически значимому увеличению длины корней и суммы фенольных соединений по сравнению с контролем 1.

Таблица 5.10 – Действие растворов солей тяжелых металлов и ВЭКШ на содержание ТБКРС и пигментов в листьях *A. сера*

Вариант	Обработка луко- виц		Исследуемый параметр			
	CuSO <sub>4</sub> , мг/л	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , мг/л	$\alpha$ -Аминоазот, мг/г	Сумма фенолов, %	Сумма хло- рофиллов, мг/г	Каротинои- ды, мг/г
1	12,5+ ЭКДШ	–	8,81±0,29	16,62±0,99 <sup>3</sup>	0,35±0,01 <sup>1,2</sup>	0,019±0,002 <sup>2</sup>
2	12,5	–	7,17±0,18 <sup>1</sup>	24,06±2,42 <sup>1,3</sup>	0,09±0,01 <sup>1,3</sup>	0,005±0,001 <sup>1,3</sup>
3	2,5+ ЭКДШ	–	8,63±0,99 <sup>2</sup>	18,21±1,71 <sup>2,3</sup>	0,25±0,03	0,022±0,004
4	2,5	–	8,04±0,15	22,13±2,73 <sup>1,3</sup>	0,18±0,04 <sup>3</sup>	0,09±0,002 <sup>1,3</sup>
5	1,25+ ЭКДШ	–	13,81±1,4 <sup>1,2,3</sup>	18,30±2,00 <sup>2,3</sup>	0,26±0,02 <sup>3</sup>	0,021±0,02 <sup>2</sup>
6	1,25	–	7,32±0,21 <sup>1</sup>	26,86±2,68 <sup>1,3</sup>	0,23±0,01 <sup>3</sup>	0,011±0,001 <sup>1,3</sup>
7	–	331+ ЭКДШ	10,29±2,17 <sup>2</sup>	20,03±2,02 <sup>2,3</sup>	0,34±0,02 <sup>1,2</sup>	0,015±0,001 <sup>1</sup>
8	–	331	8,25±0,43	21,62±2,64 <sup>1,3</sup>	0,19±0,01 <sup>1,3</sup>	0,016±0,001 <sup>1</sup>
9	–	33,1+ ЭКДШ	9,71±1,85 <sup>2</sup>	17,88±1,49 <sup>2,3</sup>	0,36±0,02 <sup>1,2</sup>	0,020±0,001 <sup>2</sup>
10	–	33,1	8,28±0,79	19,34±2,07 <sup>1,3</sup>	0,21±0,01 <sup>3</sup>	0,013±0,001 <sup>3</sup>
11	–	3,31+ ЭКДШ	10,42±0,8 <sup>1,3</sup>	17,53±1,35 <sup>3</sup>	0,46±0,02 <sup>1,2,3</sup>	0,039±0,010 <sup>2,3</sup>
12	–	3,31	8,44±0,95	24,64±2,37 <sup>1,3</sup>	0,20±0,02 <sup>3</sup>	0,016±0,001 <sup>1</sup>
13	H <sub>2</sub> O (контроль 1)		8,0±0,82	8,01±0,82	17,47±0,5 <sup>3</sup>	0,027±0,002 <sup>3</sup>
14	ЭКДШ (контроль 2)		7,6±0,44	7,62±0,44	34,00±1,93	0,019±0,002 <sup>1</sup>

Примечание – <sup>1</sup> P<0,05 по сравнению с контролем 1; <sup>2</sup> P<0,05 по сравнению с действием соли без ЭКДШ; <sup>3</sup> – P<0,05 по сравнению с контролем 2.

Обработка луковиц растворами солей меди и свинца привела в некоторых вариантах опыта (группы 1, 5) к снижению концентрации  $\alpha$ -аминоазота; дополнительное введение в растворы солей ЭКДШ способствовало росту количества  $\alpha$ -аминоазота в листьях лука в большинстве вариантов опыта (группы 2, 4, 6, 8, 10).

Поскольку зависимости доза-эффект не было выявлено, можно подтвердить ранее высказанное предположение, что, во-первых, на 9-е сутки эксперимента выявляются не острые эффекты действия химических стрессоров, а проявляются эффекты факта их действия и, во-вторых, характер изменений одного из интегральных показателей азотистого обмена –  $\alpha$ -аминоазота – свидетельствует в пользу позитивного влияния препарата ЭКДШ на регуляторном уровне. Такое заключение подтверждается характером изменений содержания суммы флавоноидов: практически во всех вариантах опыта на 9-е сутки после обработки выявлен одинаковый по степени выраженности фенольный защитный механизм, а введение препарата ЭКДШ в растворы для об-

работки луковиц сохраняет уровни фенольных соединений в области значений контроля 1.

В завершение исследований на растительных тест-системах была сделана попытка изучения действия ЭКДШ на экспрессию трех белков, участвующих в развитии стресс-реакции.

$\beta$ -глюкозидаза – общее название ферментов класса гидролаз ( $\beta$ -D-гликозидглюкогидролаза, ЕС 3.2.1.21), катализирующих гидролиз  $\beta$ -гликозидной связи при концевых невосстанавливающих  $\beta$ -D-гликозильных остатках с высвобождением  $\beta$ -D-глюкозы и агликона различной природы в синтетических и природных  $\beta$ -гликозидах и олигосахаридах. В проростках овса бета-глюкозидаза (авенакозидаза) локализуется в хлоропластах [305–307]. Особенности возрастной динамики экспрессии гена  $\beta$ -глюкозидазы при стрессе проращивания овса представлены на рисунке 5.1.

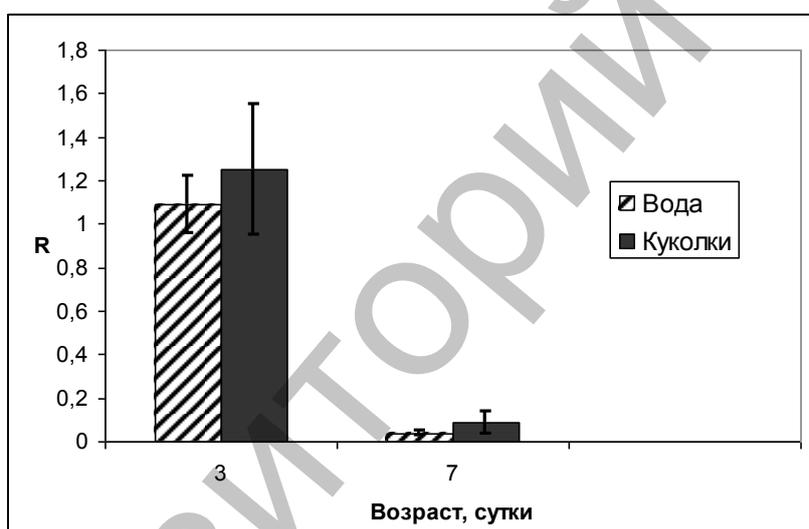


Рисунок 5.1 – Возрастные изменения R(Gluc) при действии ЭКДШ

Анализ данных, представленных на рисунке 5.1, показал, что обработка ячменя ЭКДШ через 3 суток приводит к увеличению экспрессии гена  $\beta$ -глюкозидазы незначительно, но через 7 суток этот эффект делается достоверным ( $P < 0,05$ ).

Одним из ключевых ферментов метаболизма фосфолипидов в растительной клетке является фосфолипаза D (ФлD) (ЕС 3.1.4.4). ФлD катализирует реакцию гидролиза глицерофосфолипидов по концевой фосфодиэфирной связи с образованием фосфатидной кислоты и спирта, входящего в полярную группу исходного субстрата. ФлD участвует в поддержании клеточной жизнеспособности и гомеостаза, играет важную роль в процессах прорастания семян, старения клетки, а также адаптации растительного организма к воздействию стрессовых факторов внешней среды. Этот фермент играет важную роль в защит-

ных ответах растений на различные неблагоприятные воздействия внешней среды, такие, как дефицит воды, механическое повреждение, низкие температуры, действие фитопатогенов. Помимо выполнения катаболических функций ФлD участвует в процессах сигнальной трансдукции, опосредованной фитогормонами. Фосфатидная кислота, продукт деятельности ФлD, стимулирует многие клеточные процессы, включая синтез ДНК, пролиферацию клеток, активность ряда ферментов: фосфатидилинозитолфосфат-5-киназы, фосфолипазы C, фосфолипазы A2 и различных протеинкиназ [308, 309]. Особенности экспрессии гена данного фермента под влиянием экстракта куколок дубового шелкопряда при стрессе проращивания овса представлены на рисунке 5.2.

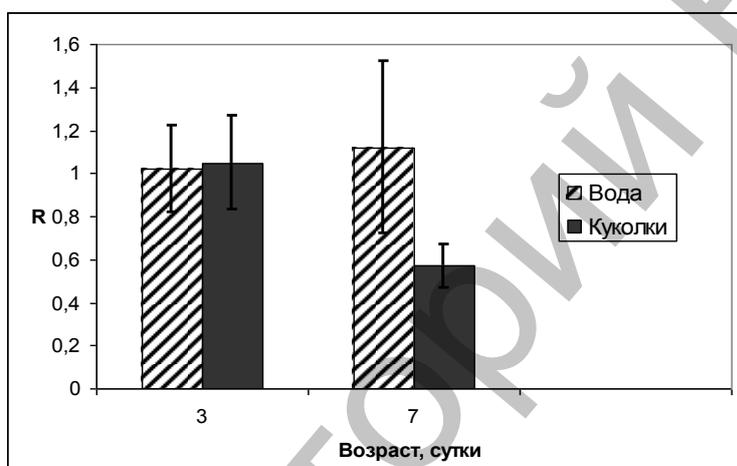


Рисунок 5.2 – Возрастные изменения R(PLDav2) при действии ЭКДШ

Из анализа приведенных данных следует, что степень экспрессии гена фосфолипазы D через 3 суток одинакова в опыте и контроле. Однако спустя 7 суток степень экспрессии гена фосфолипазы D при действии ЭКДШ достоверно ниже по сравнению с контролем (обработка водой). При интерпретации этих данных возможны две точки зрения. Во-первых, экстракт куколок дубового шелкопряда может уменьшать уровень экспрессии гена фосфолипазы D, поскольку этот путь сигналинга для растительной клетки в подобной постановке эксперимента не актуален. Во-вторых, не исключено, что ЭКДШ вызывает усиление экспрессии гена фосфолипазы D в более ранние сроки наблюдения, и эта волна экспрессии завершается уменьшением уровня экспрессии гена фермента через 7 суток.

Хромопротеин фитохром отвечает за обратимые ответы растения на свет. Фитохром может существовать в двух спектральных взаимопревращающихся формах: неактивной  $P_k$ -форме (поглощающей красный, К-свет) и физиологически активной  $P_{dk}$ -форме (поглощающей дальне-

красный, ДК-свет). Фитохром может оказывать свое рецепторное действие на уровне экспрессии генов, на уровне модуляции активности ферментов без их синтеза *de novo*, а также на мембранном уровне, связанном с изменениями эффективности ионных потоков и проницаемости мембран. Фотоответы могут реализовываться на уровне транскрипции, трансляции и/или деградации белка (медленные реакции, развивающиеся в течение десятков минут и часов) и на уровне изменения электрических и осмотических показателей клетки (быстрые реакции, протекающие в течение секунд и минут). Фитохромы выполняют в клетке различные фотосенсорные функции. Наиболее полно изучены функции *phyA* и *B*. Фитохром А опосредует процессы прорастания семян и деэтиоляции проростков на постоянном ДК-свету (FR-HIR) и индуцируемые коротким импульсом света сверхнизкоэнергетические реакции прорастания семян. Кроме того, *phyA* обеспечивает деэтиоляцию проростков, развивающихся под густым растительным покровом, в условиях, когда световое окружение обогащено ДК-светом [310].

На рисунке 5.3 представлены данные по экспрессии гена фитохрома А под влиянием экстракта куколок дубового шелкопряда при стрессе прорастания овса.

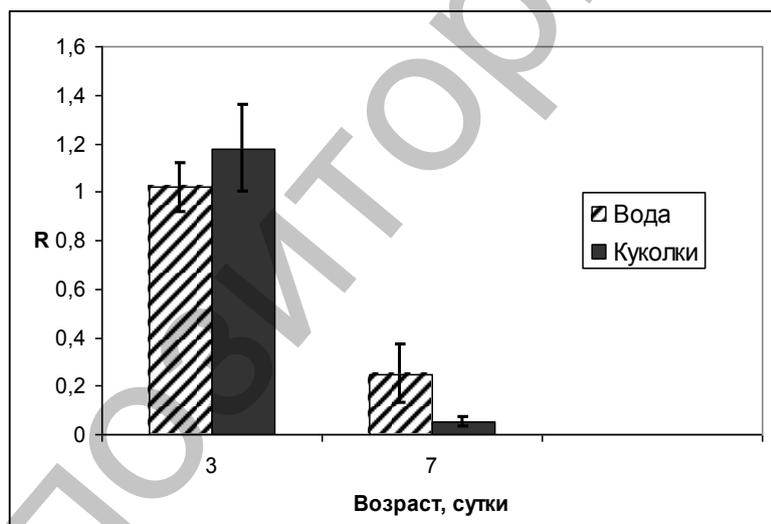


Рисунок 5.3 – Возрастные изменения R(PhyA2) при действии ЭКДШ

Результаты, приведенные на рисунке 5.3, напоминают динамику экспрессии гена фосфолипазы D: экстракт куколок дубового шелкопряда увеличивает уровень экспрессии гена фитохрома А через 3 суток и достоверно уменьшает этот показатель через 7 суток. Можно предположить, что ЭКДШ вызывает усиление экспрессии гена фитохрома А в более ранние сроки наблюдения, и эта волна экспрессии завершается уменьшением уровня экспрессии гена фермента через 7 суток.

Таким образом, при разведении жидкого содержимого куколок в 10000 раз (исходный экстракт готовится в разведении 1:10) удается зарегистрировать модулирующее действие низкомолекулярных биорегуляторов практически в гомеопатических концентрациях на экспрессию генов. Поскольку экстракт куколок дубового шелкопряда был получен методом трехкратного кипячения и удаления выпавших осадков, можно думать, что модулирующие экспрессию генов вещества следует искать, прежде всего, среди аминокислот и небольших пептидов.

### 5.3 Перспективы применения продуктов гистолита

Приведенные ранее материалы позволили обосновать состав аминокислотных смесей для профилактики окислительного стресса прорастания семян. Так как экзогенные аминокислоты влияют на рост и развитие растений, на следующем этапе оценивалось влияние фракций гемолимфы, содержащих различный набор аминокислот. Были отобраны фракции, содержащие аминокислоты (от 15-й до 30-й), для дальнейших исследований на *H. vulgare* (таблица 5.11).

Таблица 5.11 – Влияние фракций гемолимфы на длину корней, содержание ТБКРС, активность глутатионредуктазы в листьях *H. vulgare*

№ фракции	Длина корней, мм	ТБКРС, мкмоль/мин.г	ГР, мкмоль/мин.г	Каталаза, мкмоль/мин.г
Контроль (H <sub>2</sub> O)	119,5±2,76	2,5±0,14	6,1±0,12	9,7±0,40
15	139,4±2,83 <sup>1</sup>	1,7±0,16 <sup>1</sup>	5,3±0,21 <sup>1</sup>	17,2±1,60 <sup>1</sup>
16	147,4±3,44 <sup>1</sup>	2,0±0,14 <sup>1</sup>	5,4±0,48	6,9±0,42 <sup>1</sup>
17	149,7±2,75 <sup>1</sup>	2,0±0,11 <sup>1</sup>	4,2±0,38 <sup>1</sup>	9,8±2,13
18	131,7±2,66 <sup>1</sup>	3,0±0,21	4,2±13 <sup>1</sup>	4,7±1,55 <sup>1</sup>
19	132,5±2,01 <sup>1</sup>	2,0±0,16 <sup>1</sup>	4,0±0,12 <sup>1</sup>	14,1±4,23
20	135,4±1,52 <sup>1</sup>	2,8±0,24	4,5±0,33 <sup>1</sup>	6,7±0,69 <sup>1</sup>
21	145,2±2,28 <sup>1</sup>	1,7±0,16 <sup>1</sup>	4,8±0,10 <sup>1</sup>	10,5±1,51
22	149,0±2,86 <sup>1</sup>	2,0±0,14 <sup>1</sup>	5,9±0,44	7,89±2,74
23	139,2±1,67 <sup>1</sup>	1,7±0,09 <sup>1</sup>	4,5±0,31 <sup>1</sup>	10,8±0,73
24	131,4±1,87 <sup>1</sup>	2,6±0,16	4,9±0,33 <sup>1</sup>	4,3±0,63 <sup>1</sup>
25	143,0±2,71 <sup>1</sup>	1,8±0,14 <sup>1</sup>	5,3±0,35	8,3±1,70
26	131,1±2,05 <sup>1</sup>	2,1±0,16 <sup>1</sup>	5,9±0,42	6,7±0,41 <sup>1</sup>
27	136,5±2,08 <sup>1</sup>	2,1±0,15 <sup>1</sup>	6,2±0,20	7,3±2,29
28	129,4±1,83 <sup>1</sup>	2,2±0,20	4,7±0,20 <sup>1</sup>	3,0±0,53 <sup>1</sup>
29	125,3±2,66 <sup>1</sup>	2,3±0,21	6,5±0,13 <sup>1</sup>	12,2±1,04
30	126,6±1,47 <sup>1</sup>	2,3±0,08	6,0±0,26	5,4±1,90

Примечание – см. таблицу 5.1.

Как видно из таблицы 5.11, при обработке зерновок фракциями гемолимфы в разведении 1:10 в целом отмечается достоверное увеличение длины корней. Наиболее выраженное увеличение длины корней было при обработке фракциями 16 – на 23,3% по сравнению с контрольной группой, 17 – на 25,3%, 22 – на 24,7%. Самый низкий показатель при обработке содержимым фракции 29 – увеличение на 4,9%. Применение фракций гемолимфы для предпосевной обработки ячменя способствовало статистически значимому уменьшению содержания ТБКРС (фракции 15 – на 32%, 19 – на 20%, 21 и 23 – на 32%, 25 – на 28%), снижению активности глутатионредуктазы (максимальное снижение активности наблюдается при обработке фракцией № 19 – на 34,4%, № 17, 18 – на 31,1%, 20, 23 – на 26,2% по сравнению с контрольной группой). Снижение активности каталазы выявлено при обработке ячменя фракцией 15 – на 77,3%, фракциями 16 – на 28,9%, 20, 26 – на 30,9%, 30 – на 44,3% по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, показано, что все исследованные фракции гемолимфы стимулируют рост корней при прорастании ячменя. Однократная обработка зерновок фракциями гемолимфы куколок дубового шелкопряда 15, 19, 20, 21, 23, 25 приводит к снижению содержания ТБКРС и активности ГР.

Известно, что предпосевная обработка семян ячменя путем замачивания в растворах 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в низких концентрациях (0,012–0,12 мМ) приводит к ускорению роста и развития растений, увеличивает в них содержание каротиноидов. Оптимальным является использование 0,06 мМ АЛК. Аминокислота аланин не влияет на ростовые процессы, что может указывать на специфичность действия АЛК как регулятора роста и развития растений [311].

Нами на основе количественного аминокислотного состава изученных фракций гемолимфы (см. главу 4) были созданы модельные композиции аминокислот и изучено их влияние на *H. vulgare*. В состав модельной смеси № 1 вошли арг и лизин (в соотношении 1:1,4); № 2 – глу, сер, гли, тре, арг, ала, вал, фен, лей, лиз, про (3:2,5:1:6,5:96:2,5:9:3,5:1,5:136:7); № 3 – глу, тре, арг, лиз, про (4:1:80:54:2); № 4 – глу, сер, гли, тре, арг, ала, вал, иле, лей, лиз, про (1:7,5:3,3:8,9:7,3:8,5:9,1:50,4:3,9:19,5:9,9); № 5 – глу, сер, гис, гли, тре, арг, ала, вал, мет, иле, лей, лиз, про (2,0:6,7:1:3,8:4,3:1,5:3,4:2,5:2,8:20,0:1,3:1,3:2,5); № 6 – глу, сер, гис, гли, тре, арг, ала, тир, вал, мет, иле, лей, лиз, про (8,5:61,5:78,5:41,5:25:32,5:14,5:1:9,5:49,5:93:16:3:8) – таблица 5.12.

Таблица 5.12 – Искусственные смеси аминокислот, сформированные по аминокислотному составу фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда

Фракция	АК, мкМоль	Смесь АК	АК, мкМоль	Содержание аминокислот, %														
				глу	сер	гис	гли	тре	арг	ала	тир	вал	мет	иле	фен	лей	лиз	про
17	3992	1	2953	–	–	–	–	–	37	–	–	–	–	–	–	–	63	–
		2	3582	1	1	–	0,8	3	31	1,6	–	4,3	–	–	1,2	0,6	52	3,5
18	1034	3	885	3	–	–	–	1,4	51,6	–	–	–	–	–	–	–	41,6	2,4
19	6606	4	5590	1	10,2	–	6,3	10,7	5,9	13,6	–	11,1	–	5,5	–	4,2	19,2	12,3
20	9119	5	7185	4,6	20,9	2,2	17	11,9	2,9	12,6	–	7,1	0,6	5,1	–	4,8	3,1	7,2
21	6049	6	5325	2,2	2,2	19	20,8	7,8	7	6	0,2	3	1,2	2,7	–	4,6	0,8	2,7

В таблице 5.13 представлены данные о влиянии искусственных аминокислотных смесей на длину корней, содержание ТБКРС, активность глутатионредуктазы и каталазы в листьях *Hordeum vulgare*.

Таблица 5.13 – Влияние аминокислотных композиций на длину корней, содержание ТБКРС, активность глутатионредуктазы в листьях *H. vulgare*

№ фракции	Длина корней, мм	ТБКРС, мкМоль/мин·г	ГР, мкМоль/мин·г	Каталаза, мкМоль/мин·г
Контроль (H <sub>2</sub> O)	119,5±1,94	2,5±0,14	6,1±0,12	9,9±0,49
1	129,2±2,03 <sup>1</sup>	1,6±0,03 <sup>1</sup>	6,9±0,27	3,6±0,68 <sup>1</sup>
2	132,8±1,92 <sup>1</sup>	1,6±0,15 <sup>1</sup>	6,7±0,23	6,0±0,55 <sup>1</sup>
3	134,5±1,62 <sup>1</sup>	1,7±0,04 <sup>1</sup>	6,0±0,19	6,1±0,82 <sup>1</sup>
4	138,2±1,35 <sup>1</sup>	1,6±0,13 <sup>1</sup>	7,1±0,25	7,2±0,26 <sup>1</sup>
5	134,6±1,94 <sup>1</sup>	1,5±0,06 <sup>1</sup>	6,6±0,19	6,5±0,31 <sup>1</sup>
6	131,6±1,76 <sup>1</sup>	1,8±0,10 <sup>1</sup>	6,5±0,20	4,8±0,38 <sup>1</sup>

Примечание – см. таблицу 5.1.

Согласно данным таблицы 5.11 обработка зерновок ячменя фракциями гемолимфы 17 и 21 обеспечила наибольший прирост корней (на 25,3% и 21,5%, соответственно). По аминокислотному составу фракции 17 были приготовлены 2 искусственные смеси аминокислот: первая содержала аргинин и лизин (относительное содержание 37% и 63%, соответственно); вторая – аргинина 31%, лизина 52%, а остальные 17% включали глу, сер, гли, тре, ала, вал, фен, лей, про.

Оказалось, что обе смеси аминокислот обеспечили примерно одинаковый прирост корней на 8,1% и 11,1%, соответственно (таблица 5.13). Поскольку различия в длине корней первой и второй групп оказались статистически недостоверными, было сделано заключение, что основной вклад в стимулирующее действие смесей 1 и 2 на рост корней вносили аргинин и лизин. Обработка зерновок ячменя фракцией гемолимфы 21 привела к увеличению прироста корней на 21,5%. Однако содержание аргинина и лизина составило всего лишь 7% и 0,8%, соответственно. В отличие от предыдущих фракций, во фракции 21 содержалось повышенное количество гистидина и глицина. В искусственной аминокислотной смеси 6, составленной по аминокислотному составу фракции 21, на долю гистидина и глицина приходилось 19,0% и 20,8%, соответственно. Глицин не играет важной роли в стимуляции роста корней, поскольку в смесях 5 и 6, обеспечивающих одинаковый прирост, относительное содержание глицина одинаковое, но доля гистидина в смеси 6 в 8,5 раза больше, чем в смеси 5. Поэтому стимули-

рующий прорастание зерновок ячменя эффект фракции 21 гемолимфы наиболее вероятно связан с повышенным содержанием гистидина.

При использовании модельных смесей аминокислот увеличивается длина корней: при обработке смесями аминокислот № 1, 2, 3, 4, 5 и 6 длина корешков увеличилась по сравнению с контролем на 8,1%, 11,1%, 12,6%, 15,6%, 12,6% и 10,1%. Минимальное увеличение наблюдается при обработке смесью № 1 и максимальное увеличение наблюдается при обработке смесью № 4. Анализ данных таблицы 5.12 показал, что основную роль в стимуляции роста корней оказывают основные аминокислоты аргинин, лизин и гистидин. Другие аминокислоты, включая незаменимые, оказывают вспомогательное стимулирующее действие.

При обработке ячменя смесями аминокислот № 1, 2 и 4 содержание ТБКРС снижается на 36%, при обработке смесями аминокислот № 3 – на 32%, № 5 – на 40% и № 6 – на 28%. Снижение содержания ТБКРС может быть обусловлено увеличением активности антиоксидантных ферментов.

Выявлено, что при обработке смесями аминокислот в проростках ячменя снижается активность каталазы. Наиболее выраженное снижение активности каталазы наблюдается при обработке смесью аминокислот № 1 – на 64% по сравнению с контролем. При обработке смесями аминокислот № 2, 3, 4, 5 и 6 активность снижается на 39%, 38%, 27%, 34% и 51% соответственно.

Модельные композиции аминокислот оказывают стимулирующий эффект на рост и развитие ячменя, что доказывается увеличением длины корешков, и антиоксидантное действие, о чем свидетельствует уменьшение содержания малонового диальдегида и уменьшение активности каталазы. Наиболее оптимальной является смесь аминокислот № 4, содержащая глут (1%), сер (10,2%), гли (6,3%), тре (10,7%), арг (5,9%), ала (13,6%), вал (11,1%), иле (5,5%), лей (4,2%), лиз (19,2%), про (12,3%) с общим содержанием аминокислот 5,59 ммоль/л.

## ГЛАВА 6

### АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы было на основе выявленного химического состава содержимого куколок дубового шелкопряда создать природные композиции эндогенных антиоксидантов и определить биохимические эффекты их действия на нормальные, трансформированные клетки и тканевые системы. Для достижения поставленной цели были проведены исследования жидкого содержимого куколок, экстракта куколок, фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда (китайской дубовой павлиноглазки) (*Antheraea pernyi* G.-M.), искусственных аминокислотных композиций; изучены химический состав содержимого куколок шелкопряда; биохимические механизмы действия гемолимфы и фракций; цитотоксичность содержимого куколок дубового шелкопряда; генерация активных форм кислорода нейтрофилами; показатели окислительного стресса; экспрессия генов синтеза стрессовых белков.

Получены доказательства запрограммированного разрушения клеток личинок V возраста по механизмам апоптоза как способа формирования химических составляющих гемолимфы куколок. В процессе диапаузы установлено: 1) увеличение концентрации калия, что свидетельствует о перманентном разрушении плазматических мембран клеток и выходе из них калия; 2) увеличение концентрации мочевой кислоты как объективный признак распада пуриновых нуклеотидов и возрастающий по мощности фактор антиоксидантной защиты. Транспортные формы энергии – глюкоза и триглицериды – имели тенденцию к накоплению, начиная с ноября месяца. Сформулировано понятие «эндогенный антиоксидантный комплекс гемолимфы куколок дубового шелкопряда», включает комплекс антиоксидантных молекул – витамины А, Е, С, мочевую кислоту, аминокислоты антиоксидантного действия (про, сер, тау, тре, тир, мет, арг, гли, глу, асп), глутатион, фенольные соединения, белок, подобный липопротеинам высокой плотности. Методом гель-хроматографии гемолимфы куколок на сефадексе G-25 fine получены 3 пика (группы веществ): первый содержит белки, полинуклеотиды и полифенольные соединения, а также комплексы белков с низкомолекулярными биорегуляторами; второй содержит пептиды (глутатион), аминокислоты, незначительные количества белка и фенольных соединений; третий содержит низкомолекулярные биорегуляторы фенольной природы. Из второго пика фракций гемолимфы выделено 6 групп аминокислот: 1) гистидин, лизин, аргинин, серин, глицин и цистатионин (500–2500 мкмоль/л фракции); 2) треонин, аланин, валин, изолейцин и пролин (100–900 мкмоль/л); 3) 6 аминокислот, включая лейцин (50–350 мкмоль/л); 4) фосфоэтаноламин, метионин, фенилаланин (20–140 мкмоль/л); 5) 5 ами-

нокислот и азотсодержащих метаболитов (5–35 мкмоль/л); 6) триптофан, таурин, аспарагиновая кислота, тирозин (5–35 мкмоль/л).

Гемолимфа куколок является продуктом гистолиза тканей личинки V возраста. В ней сконцентрированы как продукты распада тканей, так и экзогенные молекулы-антиоксиданты, поступившие с пищей в организм личинок. В результате гемолимфа куколок в 10 раз сильнее ингибирует реакцию Фентона, чем гемолимфа личинок V возраста. При вычислении 50% ингибирования образования АФК показано, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + НОСІ в 200 раз, люминол + пероксидаза хрена +  $H_2O_2$  в 200 раз, люминол + миелопероксидаза +  $H_2O_2$  в 500 раз, генерации АФК нейтрофилами при адгезии в 700 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии fMet-Leu-Phe в 300 раз и генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии латекса в 4000 раз.

Гомогенат расплода пчел уступает антиоксидантной активности ГКДШ в 100–1000 раз. Растения, обладающие наиболее высокой антиоксидантной активностью (зверобой продырявленный, лабазник вязолистный, рута душистая), уступают по антиоксидантной активности ГКДШ в 2,5–10 раз. Таким образом, в природе был найден объект с уникальной и мощной эндогенной антиоксидантной системой.

Антиоксидантная активность проявляется в гемолимфе в очень высоких разведениях. Так выход АФК, генерируемых нейтрофильными лейкоцитами при адгезии, снижается на 50% при количестве гемолимфы в среде, соответствующем разбавлению в 500 раз, а при воздействии на нейтрофилы fMLP и латекса снижение выхода АФК на 50% наблюдается при разбавлении гемолимфы более чем в  $10^4$  раз.

Компоненты гемолимфы куколок дубового шелкопряда могут напрямую влиять на МПО-зависимые реакции, не повреждая при этом мембраны. Гемолимфа способна тормозить секрецию МПО во внеклеточную среду при активации клеток в процессе адгезии и при действии fMLP. Ингибирующий эффект компонентов гемолимфы на генерацию АФК при действии fMLP слабо зависит от блокатора активации 5-липоксигеназы (МК-886) и ингибитора фосфатидил-инозитол-3-киназы (LY294002). В то же время ингибирующее действие гемолимфы на образование АФК при активации нейтрофилов в процессе адгезии значительно снижается при блокировании 5-липоксигеназы и фосфатидил-3-киназы. Такой результат подтверждает, что действие гемолимфы не ограничивается лишь влиянием на активность МПО, но и включает изменение процессов внутриклеточной сигнализации.

В дальнейшем было исследовано биологическое действие гемолимфы куколок дубового шелкопряда, прежде всего, на основе ее эндогенной антиоксидантной системы. Показано, что нативная и разбавленная в 5 раз гемолимфа куколок дубового шелкопряда ингибирует процесс ПОЛ мембран эритроцитов, инициированный введением

tBOOH, на 65–55% на фоне сохранения концентрации восстановленного глутатиона.

Установлено, что фракции гемолимфы способны оказывать про-аптогенное действие на мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани крысы. Уменьшение содержания аминокислот во фракциях 24–29 в 20 раз по сравнению с фракциями 17–23, а также увеличение относительного содержания фенилаланина и тирозина является одной из причин увеличения количества яркоокрашенных CFSE клеток, т.е. клеток, прошедших меньшее количество делений и менее жизнеспособных.

Используя МТТ-тест и окраску кристаллвиолетом удалось показать, что при культивировании клеток гепатомы Нер G2 обнаружено ингибирующее рост (цитотоксическое) действие фракций 18–22, сменяемое в дальнейшем активацией роста трансформированных клеток. В противоположность действию большинства исследованных культур трансформированных клеток рост нормальных фибробластов кожи человека усиливался компонентами фракций 18–20. В этих фракциях было высокое содержание аргинина и лизина. Впервые удалось разделить ингибирующую практически до нуля (фракции 17–20) и активирующую на 285% активности во фракциях 22–28 гемолимфы. Вероятно, ингибирующая активность служит для сохранения состояния диапаузы, а активирующая – включает метаморфоз и формирование тканей бабочки. Цитотоксический и подавляющий биосинтез ДНК эффект фракций гемолимфы в клетках гепатомы Нер G2 оказывают фракции гемолимфы, содержащие повышенные количества глутаминовой кислоты, аспарагина, серина, глицина, треонина, цитрулина, бета-аланина, аланина, изолейцина, лейцина, гидроксипролина, лизина и пролина (кроме аргинина и лизина). Эти же аминокислоты обеспечивают стимуляцию деления нормальных фибробластов. Усиленный рост трансформированных клеток сопряжен с относительно повышенным содержанием фенилаланина, тирозина, таурина и цистатионина по отношению к другим азотсодержащим веществам. Эти вещества являются эндогенными антиоксидантами.

По ингибирующему действию на окисление люминола в системе ПХ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> можно выделить 3 пика: 1-й – это фракции 8–11, 2-й – фракции 24–27, 3-й пик – фракции 46–55. Данные фракции выделяются в отдельные пики и по ингибированию ХЛ в системе с гипохлоритом натрия. Следовательно, хроматография на сефадексе G-25 fine позволила определить в гемолимфе три отдельные группы веществ, которые способны ингибировать ХЛ, сопровождающую процессы окисления, катализируемые миелопероксидазой. Данные эффекты устойчивы, воспроизводились в отношении клеток различных здоровых доноров, не снижались при хранении образцов при +4°C в течение 6 месяцев.

При внутрижелудочном введении крысам экстракта куколок дубового шелкопряда было показано усиление собственной эндогенной антиоксидантной системы тканей за счет прироста концентрации

антиоксидантных аминокислот: цистеина в 8 раз, таурина в 2 раза и цистатионина в 10 раз в лимфоцитах печени. Выявлены тенденции к накоплению таурина в 2 раза в лимфоцитах селезенки и повышению образования цистеина в лимфоцитах тимуса.

На следующем этапе работы были исследованы эффекты продуктов гистолиза в виде гемолимфы или ее экстракта на растительных объектах. Такой подход был обоснован относительной простотой и воспроизводимостью растительных тканевых систем (проращивание семян, *Allium*-тест, моделирование окислительного стресса). Так, для роста и развития ячменя и лука наиболее эффективными оказались разведения экстракта куколок шелкопряда и оксидата торфа 1:10<sup>4</sup>–1:10<sup>5</sup> – статистически достоверное увеличение длины корней, снижение активности каталазы и содержания ТБКРС. В *Allium*-тесте ЭКДШ в разведениях 1:10 и 1:10<sup>2</sup> уменьшал суммарное содержание хлорофиллов *a+b*, но увеличивал содержание каротиноидов, а в разведениях 1:10<sup>4</sup> и 1:10<sup>5</sup> увеличивал содержание суммы хлорофиллов *a+b* на фоне нормального содержания каротиноидов. Препарат оксидата торфа в больших разведениях уменьшал содержание суммы хлорофиллов (1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>) и содержание каротиноидов (1:10<sup>6</sup>). Эти данные доказывают преимущества препарата ЭКДШ над препаратом оксидата торфа в действии на фотосинтетический аппарат листьев лука.

Под влиянием температурного стресса в листьях ячменя достоверно увеличивались содержание ТБК-реагирующих продуктов на 56–68% и активность антиоксидантных ферментов каталазы на 49–58% и глутатионредуктазы на 6,6%. Оксидат торфа и ЭКДШ снижали содержание ТБК-реагирующих продуктов на 40–48 и 43–50%, соответственно. ЭКДШ, в отличие от оксидата торфа, в 2 раза более значимо уменьшал активность глутатионредуктазы и на 40% снижал активность каталазы.

Установлено, что после обработки проросших луковиц *A. сера* солями CuSO<sub>4</sub> и Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> через 9 суток в зеленых листьях лука обнаруживаются признаки окислительного стресса в виде повышения концентрации продуктов ПОЛ. Сохранение активированного перекисным окислением липидов состояния сопряжено с угнетением роста корней. Обработка луковиц солями CuSO<sub>4</sub> и Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в сочетании с ЭКДШ частично препятствовала увеличению показателей ПОЛ (ТБКРС, ДК), что вело к нормализации развития корней. Положительный эффект экзогенного антиоксиданта ЭКДШ, вероятно, способствует сохранению эндогенных антиоксидантных ферментов (СОД, ГР) листьев лука в области контрольных значений. Поэтому экстракт куколок дубового шелкопряда благодаря наличию в составе антиоксидантов может рекомендоваться для защиты растений от развития окислительного стресса, вызванного действием солей тяжелых металлов.

Установлено, что в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда имеются вещества, способные модулировать экспрессию генов трех белков – β-глюкозидазы, фосфолипазы D и фитохрома A.

Эти белки участвуют в процессах трансдукции сигналов и развитии ответов растения на стрессовые воздействия разной природы. Экстракт куколок дубового шелкопряда в разведении в 10000 раз повышал уровень экспрессии гена  $\beta$ -глюкозидазы через 7 суток после обработки семян и, возможно, вызывал волну повышения уровня экспрессии генов фосфолипазы D и фитохрома A в интервале 3–7 сутки после обработки семян *A. sativa*.

При выполнении работы были осуществлены исследования, направленные на внедрение их результатов. Выявлено, что обработка ячменя фракциями гемолимфы, содержащими широкий спектр аминокислот, приводит к стимуляции роста корней растений. Некоторые фракции способствуют снижению содержания ТБКРС и активности ГР. Модельные смеси аминокислот, созданные на основе аминокислотного состава фракций гемолимфы, оказывают стимулирующий эффект на рост и развитие ячменя, что доказывается увеличением длины корней, и обладают антиоксидантным действием, о чем свидетельствует уменьшение содержания ТБКРС и активности каталазы. Показано, что для стимуляции роста и развития злаковых целесообразно использовать смесь аминокислот, содержащую глутаминовую кислоту, серин, глицин, треонин, аргинин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, лизин, пролин.

Таким образом, в результате проведенных исследований в природе был найден объект с уникальной эндогенной антиоксидантной системой, образованной в процессе гистолиза тканей, и на его основе созданы композиции, с помощью которых достигнуто управление биохимическими процессами клеток и тканей эукариотических организмов.

Итак, в результате гистолиза личинок V возраста образуется жидкость, содержащая 14,6 г/л свободных аминокислот. Это почти в 30 раз больше, чем в плазме крови человека. В гемолимфе куколок содержание основных аминокислот (аргинин, гистидин, лизин) составляет 26%, что в 2 раза больше, чем в плазме крови человека. Высокое содержание аргинина и лизина связано с распадом гистонов. На основе антивирусного действия лизина можно предположить его участие в механизмах подавления жизнеспособности клеток на ранних этапах диапаузы. На этапе перехода к гистогенезу лизин и аргинин должны использоваться для синтеза гистонов во вновь формируемых клетках. Их концентрация уменьшается, и проявляется действие гистидина с его ростостимулирующими и антиоксидантными эффектами. Это предположение подтверждают данные о влиянии фракций гемолимфы, содержащих лизин + аргинин (17–19) и гистидин (21–23), на рост и биосинтез ДНК в клетках гепатомы Нер G2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты расширяют современные представления о процессе гистолиза.

Результатом гистолиза личинок V возраста является формирование эндогенной антиоксидантной системы куколок дубового шелкопряда, включающей витамины А, Е, С, мочевую кислоту, аминокислоты антиоксидантного действия (пролин, серин, таурин, треонин, тирозин, метионин, аргинин, глицин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты), глутатион, фенольные соединения, белок, подобный липопротеинам высокой плотности. Компоненты эндогенной антиоксидантной системы присутствуют во фракциях макромолекул, пептидов и низкомолекулярных биорегуляторов содержимого куколок дубового шелкопряда.

Фракции гемолимфы оказывают проаптогенное действие на мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани крысы, что сопровождается уменьшением способности их к делению. Лизин- и аргининсодержащие фракции гемолимфы стимулируют рост нормальных фибробластов кожи человека, но оказывают цитотоксическое действие на клетки гепатомы Нер G2. Выявлены фракции гемолимфы, оказывающие ингибирующее до нуля и активирующее на 275% действие на биосинтез ДНК в клетках гепатомы Нер G2.

Гемолимфа куколок в 10 раз сильнее ингибирует образование гидроксильного анион-радикала, чем гемолимфа личинок V возраста. По 50% ингибированию образования активных форм кислорода гемолимфа куколок дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + НОС1 в 200 раз, люминол + миелопероксидаза хрена + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 200 раз, люминол + миелопероксидаза + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 500 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при адгезии в 700 раз, генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии формил-метионил-лейцил-фенилаланина в 300 раз и генерации активных форм кислорода нейтрофилами при действии латекса в 4000 раз. Гомогенат расплода пчел уступает антиоксидантной активности гемолимфы куколок дубового шелкопряда в 100–1000 раз. Растения, обладающие наиболее высокой антиоксидантной активностью (зверобой продырявленный – трава, лабазник вязолистный – цветки, рута душистая – трава), уступают по антиоксидантной активности гемолимфе куколок дубового шелкопряда, как минимум, в 2,5–10 раз.

Нативная и разбавленная в 5 раз гемолимфа куколок дубового шелкопряда ингибирует процесс перекисного окисления липидов мембран эритроцитов, инициированный введением терт-бутила гид-

ропероксида, на 55–65% при сохранении концентрации восстановленного глутатиона. По ингибирующему действию на окисление люминола в системе пероксидаза хрена +  $H_2O_2$  и по ингибированию хемилюминесценции в системе с гипохлоритом натрия выделены 3 группы фракций гемолимфы: фракции макромолекул; фракции, содержащие пептиды и аминокислоты; фракции, содержащие низкомолекулярные биорегуляторы. Данное деление воспроизводимо, и выявленные эффекты сохраняются при хранении фракций в течение 6 месяцев. Ингибирование на 50% генерации активных форм кислорода нейтрофильными лейкоцитами выявлено при адгезии в случае разбавления гемолимфы в 500 раз, а при воздействии формилметиониллейцил-фенилаланина и латекса – при разбавлении гемолимфы более, чем в 10000 раз. Компоненты гемолимфы куколок дубового шелкопряда могут напрямую влиять на зависимые от миелопероксидазы реакции, не повреждая при этом мембраны, а также действовать через механизмы внутриклеточной сигнализации (фосфатидилинозитольный и липоксигеназные пути).

При внутривенном введении крысам экстракта куколок дубового шелкопряда происходит усиление собственной эндогенной антиоксидантной системы тканей за счет прироста концентрации антиоксидантных аминокислот цистеина в 8 раз, таурина в 2 раза и цистатионина в 10 раз в лимфоцитах печени. Выявлены тенденции к накоплению таурина в 2 раза в лимфоцитах селезенки и повышению образования цистеина в лимфоцитах тимуса. Показано профилактическое действие экстракта куколок дубового шелкопряда в разведениях  $1:10^4$ – $1:10^5$ , предупреждающее развитие окислительного стресса на простых растительных тест-объектах. При разведении жидкого содержимого куколок в 10000 раз удается зарегистрировать модулирующее действие низкомолекулярных биорегуляторов на экспрессию генов трех стрессовых белков растений –  $\beta$ -глюкозидазы, фосфолипазы D и фитохрома A.

Определен аминокислотный состав фракций гемолимфы, которые при обработке зерновок ячменя приводят к стимуляции роста корней на фоне снижения интенсивности перекисного окисления липидов. На основе этих фракций созданы модельные смеси аминокислот (глутаминовая кислота, серин, глицин, треонин, аргинин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, лизин, пролин в соотношении 1:7,5:3,3:8,9:7,3:8,5:9,1:50,4:3,9:19,5:9,9 соответственно), оказывающие аналогичный стимулирующий эффект на рост и развитие ячменя.

Результаты исследования имеют практическое применение. Аминокислотный состав фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда рекомендуется как прототип создания искусственных аминокислотных смесей для проращивания семян и борьбы с проявлениями

окислительного стресса, а также для разработки фармацевтических субстанций для подавления или стимуляции деления клеток и их гибели. Экстракт куколок шелкопряда может быть удобным объектом для поиска и выделения факторов, регулирующих экспрессию генов, отвечающих за процессы гистолиза и гистогенеза. Результаты внедрены в производство общества с ограниченной ответственностью «Рубикон» и в работу отдела биохимической фармакологии ГП «Институт биологически активных соединений НАН Беларуси».

Результаты исследования биологической активности продуктов гистолиза рекомендуется использовать в образовательном процессе на кафедрах биологии, биохимии и биотехнологии.

Экстракт куколок дубового шелкопряда возможно применять с целью профилактики негативных последствий окислительного стресса прорастания зерновок, экстремальных температур и солей тяжелых металлов. Результаты внедрены на коммунальном производственном унитарном предприятии «Витебская биофабрика» (в настоящее время открытое акционерное общество «БелВитунифарм»).

Материалы исследования включены в каталог инновационных разработок постоянно действующей выставки ГУ «БелИСА»: «Биологическая активность продуктов гистолиза: теоретическое обоснование и практическое использование» и «Применение водного экстракта куколок дубового шелкопряда для профилактики окислительного стресса у растений».

По результатам работы получен патент на изобретение «Способ получения средства для профилактики инсулинорезистентности» (№ 15645 от 30.04.12).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

### Список использованных источников

1. Чиркин, А.А. Биохимия: учеб. руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Мед. лит., 2010. – 624 с.
2. Черенкевич, С.Н. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С.Н. Черенкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2013. – № 1. – С. 92–108.
3. Пристром, А.М. Оксидативный стресс и сердечно-сосудистые заболевания / А.М. Пристром, М. Бенхамед // Лечебное дело. – 2012. – № 1 (23). – Ч. 1. – С. 21–28.
4. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
5. Меньщикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 442–455.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологич. химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
7. Novo, E. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis / E. Novo, M. Parolo // Fibrogenesis Tissue Repair. – 2008. – Vol. 1. – P. 5–63.
8. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe / S.J. Klebanoff // J. Leukoc. Biol. – 2005. – Vol. 77. – P. 598–625.
9. Podrez, E.A. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis / E.A. Podrez, H.M. Abu-Soud, S.L. Hazen // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 28. – P. 1717.
10. Коваленко, Е.И. Хемилюминесцентный метод в открытии антиоксидантной активности гемолимфы куколок дубового шелкопряда / Е.И. Коваленко, А.А. Чиркин // Современные проблемы биохимии: учеб. пособие / О.Ю. Абакумова [и др.]; под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2010. – С. 58–80.
11. Kavalenka, A.I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A.I. Kavalenka, G.N. Semenkov, S.N. Cherenkevich // Cell and Tissue Biology. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 551–559.
12. Starodubtseva, M.N. Effects of peroxyxynitrite on morphology and functions of neutrophils / M.N. Starodubtseva [et al.] // Handbook of free

radicals: formation, types and effects. – Nova Science Publishers, 2010. – 642 p.

13. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты) / О.Ю. Янковский. – СПб.: Игра, 2000. – 294 с.

14. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биомембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 272 с.

15. Надольник, Л.И. Методы исследования активности антиоксидантной системы и свободнорадикальных процессов в клетках и тканях / Л.И. Надольник, О.И. Валентюкевич // Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие / Е.В. Барковский [и др.]; под ред. проф. А.А. Чиркина. – Минск: Вышш. шк., 2013. – С. 158–196.

16. Kennedy, A.D. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection / A.D. Kennedy, F.R. De Leo // Immunol. Res. – 2009. – Vol. 43. – P. 25–61.

17. Дремза, И.К. Митохондрии и свободные радикалы / И.К. Дремза [и др.] // Современные проблемы биохимии: учеб. пособие / О.Ю. Абакумова [и др.]; под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2010. – С. 109–138.

18. Boveris, A. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen / A. Boveris, B. Chance // Biochem. J. – 1973. – Vol. 134. – P. 707–716.

19. Boveris, A. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide / A. Boveris, E. Cadenas, A.O. Stoppani // Biochem. J. – 1976. – Vol. 156. – P. 435–444.

20. Cadenas, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria / E. Cadenas [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1977. – Vol. 180. – P. 248–257.

21. Dionisi, O. Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues / O. Dionisi [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – Vol. 403. – P. 292–300.

22. Cadenas, E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging / E. Cadenas, K.J. Davies // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 29. – P. 22–30.

23. Sun, J. Superoxide anion generation by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex / J. Sun, B.L. Trumpower // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol. 419. – P. 198–206.

24. Zhang, L. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria / L. Zhang // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 33972–33976.

25. Orrenius, S. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death / S. Orrenius, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2007. – Vol. 47. – P. 143–183.
26. Miwa, S. The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria / S. Miwa, M. Brand // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1709. – P. 214–219.
27. Mracek, T. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria / T. Mracek [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – Vol. 481. – P. 30–36.
28. Bortolato, M. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics / M. Bortolato, K. Chen, J.C. Shih // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 1527–1533.
29. Vindis, C. Dopamine induces ERK activation in renal epithelial cells through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by monoamine oxidase / C. Vindis [et al.] // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 59. – P. 76–86.
30. Lin, M.T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M.T. Lin, M.F. Beal // *Nature.* – 2006. – Vol. 443. – P. 787–795.
31. Shigenaga, M.K. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging / M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, B.N. Ames // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 10771–10778.
32. Cadenas, E. Mitochondrial free radical production, antioxidant defenses and cell signaling / E. Cadenas, A. Boveris // *The handbook of environmental chemistry.* – 2005. – Vol. 2. – P. 219–234.
33. Gutierrez, J. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids / J. Gutierrez [et al.] // *Circulation.* – 2006. – Vol. 99. – P. 924–932.
34. Takabe, W. Oxidized low-density lipoprotein-activated c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase regulates manganese superoxide dismutase ubiquitination / W. Takanabe [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 436–441.
35. Spencer, N.Y. Control of hepatic nuclear superoxide production by glucose 6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase / N.Y. Spencer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 8977–8987.
36. Ungvari, Z. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells / Z. Ungvari [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 297. – P. H1876–H1881.
37. Addabbo, F. The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach / F. Addabbo [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 174. – P. 34–43.
38. Madamanchi, N.R. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis / N.R. Madamanchi, M.S. Runge // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100. – P. 460–473.

39. Mukhopadhyay, P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells / P. Mukhopadhyay [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 358. – P. 203–208.
40. Wang, W. Superoxide flashes in single mitochondria / W. Wang [et al.] // *Cell.* – 2008. – Vol. 134. – P. 279–290.
41. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol. Rev.* – 1979. – Vol. 59. – P. 527–605.
42. Poderoso, J.J. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol / J.J. Poderoso [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 37709–37716.
43. Jekabsone, A. Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release / A. Jekabsone [et al.] // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2003. – Vol. 35. – P. 803–809.
44. Brown, G.C. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols / G.C. Brown, V. Borutaite // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1658. – P. 44–49.
45. Barrientos, A. Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process / A. Barrientos [et al.] // *Biochemical and Molecular Medicine.* – 1997. – Vol. 62. – P. 165–171.
46. Cherney, D.Z. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the renal hemodynamic response to L-arginine / D.Z. Cherney [et al.] // *Kidney Int.* – 2009. – Vol. 75. – P. 327–332.
47. Radi, R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 33. – P. 1451–1464.
48. Clementi, E. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione / E. Clementi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 7631–7636.
49. Riobo, N.A. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation / N.A. Riobo [et al.] // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 359. – P. 139–145.
50. Valdez, L.B. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix / L.B. Valdez [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 29. – P. 349–356.
51. Beckman, K.B. The free radical theory of aging matures / K.B. Beckman, B.N. Ames // *Physiol. Rev.* – 1998. – Vol. 78. – P. 547–581.
52. Gonzalez-Flecha, B. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion / B. Gonzalez-Flecha, J.C. Cutrin, A. Boveris // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 91. – P. 456–464.

53. Bonini, M.G. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide / M.G. Bonini [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 10802–10806.

54. Grune, T. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells / T. Grune, T. Reinheckel, K.J.A. Davies // *FASEB J.* – 1997. – Vol. 11. – P. 526–534.

55. Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects / K.J.A. Davies // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262. – P. 9895–9901.

56. Stadtman, E.R. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function / E.R. Stadtman // *Trends Biochem. Sci.* – 1986. – Vol. 11. – P. 11–12.

57. Wolff, S.P. Free radicals, lipids, and protein degradation / S.P. Wolff, A. Garner, R.T. Dean // *Trends Biochem. Science.* – 1986. – Vol. 11. – P. 27–31.

58. Berlett, B.S. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress / B.S. Berlett, E.R. Stadtman // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 33. – P. 20313–20316.

59. Sano, M. Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis / M. Sano, K. Fukuda // *Circ Res.* – 2008. – Vol. 103. – P. 1191–1193.

60. Tortora, V. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation / V. Tortora [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42. – P. 1075–1088.

61. Yan, L.J. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase / L.J. Yan, R.L. Levine, R.S. Sohal // *Proc. Natl. Acad. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 11168–11172.

62. Bulteau, A.L. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria / A.L. Bulteau, M. Ikeda-Saito, L.I. Szveda // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 14846–14855.

63. Stoessel, A. Indolent course of tubulointerstitial disease in a mouse model of subpressor, low-dose nitric oxide synthase inhibition / A. Stoessel [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – F717–F725.

64. Ott, M. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria / M. Ott, B. Zhivotovsky, S. Orrenius // *Cell Death Differ.* – 2007. – Vol. 14. – P. 1243–1247.

65. Donatti, A. Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions / A. Donatti [et al.] // *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* – 2001. – Vol. 56. – B375–B383.

66. Baehrecke, E.H. Autophagy: dual roles in life and death? / E.H. Baehrecke // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 505–510.

67. Codogno, P. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death / P. Codogno, A.J. Meijer // *Cell Death Differ.* – 2005. – Vol. 12. – Suppl 2. – P. 1509–1518.

68. Lemasters, J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging / J.J. Lemasters // *Rejuvenation Res.* – 2005. – Vol. 8. – P. 3–5.

69. Kiffin, R. Oxidative stress and autophagy / R. Kiffin, U. Bandyopadhyay, A.M. Cuero // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – Vol. 8. – P. 152–162.

70. Lemasters, J.J. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy / J.J. Lemasters [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1366. – P. 177–196.

71. Chen, Y. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species / Y. Chen [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 4155–4166.

72. Kessel, D. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage / D. Kessel, J.J. Reiners // *Photochem. Photobiol.* – 2007. – Vol. 83. – P. 1024–1028.

73. Зайчик, А.Ш. Основы общей патологии. Ч. I: Основы общей патофизиологии: учеб. пособие для студентов медвузов / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов / СПб.: ЭЛБИ, 1999. – 624 с.

74. Клюбин, И.В. НАДФН-оксидаза – специализированный ферментативный комплекс для образования активных метаболитов кислорода / И.В. Клюбин, И.А. Гамалей // *Цитология.* – 1997. – Т. 39, № 4, 5. – С. 320–341.

75. Marcius, W.D. Experimental studies of membrane tethers formed from human neutrophils / W.D. Marcius, R.M. Hochmuth // *Annals Biomed. Engineering.* – 2002. – Vol. 30. – P. 1273–1280.

76. Nüsse, O. Biochemistry of the phagosome: the challenge to study a transient organelle / O. Nüsse // *Scient. World J.* – 2011. – Vol. 11. – P. 2364–2381.

77. Зинченко, В.П. Внутриклеточная сигнализация / В.П. Зинченко, Л.П. Долгачева. – Минск: Электронное издательство «Аналитическая микроскопия», 2003. – 84 с.

78. Simon, H.U. Neutrophil apoptosis pathways and their modification in inflammation / H.U. Simon // *Imunol. Rev.* – 2003. – Vol. 193. – P. 101–110.

79. Yan, Y. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling / Y. Yan [et al.] // *Acta Pharmacol. Sinica.* – 2006. – Vol. 27, № 7. – P. 821–826.

80. Takahashi, A. Measurement of intracellular calcium / A. Takahashi [et al.] // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79. – P. 1089–1125.

81. Коваленко, Е.И. Методы исследования биохимии фагоцитоза / Е.И. Коваленко, А.А. Чиркин // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие* / ред. А.А. Чиркин. – Минск: Выш. шк., 2013. – С. 318–341.

82. Chen, M.F. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis / M.F. Chen // *Free Radic. Bio. Med.* – 1997. – Vol. 23, № 4. – P. 672–679.

83. Maeda, H. Oxygen free radicals as pathogenic molecules in viral diseases / H. Maeda, T. Alaike // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 198, № 2. – P. 721–727.

84. Emerit, I. Oxidative stress in chronic hepatitis C: a preliminary study on the protective effects of antioxidant flavonoids / I. Emerit [et al.] // *Hepatogastroenterology.* – 2005. – Vol. 52, № 62. – P. 530–536.

85. Emerit, I. Clastogenic factors in the plasma of patients with hepatitis C: their possible role at the origin of hepatocarcinoma / I. Emerit [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2007. – Vol. 179, № 1. – P. 31–35.

86. Goh, K. Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in plasma of persons exposed to total-body irradiation? / K. Goh, H. Sumner // *Radiat. Res.* – 1968. – Vol. 35, № 1. – P. 171–181.

87. Emerit, I. Clastogenic factors as biomarkers of oxidative stress in chronic hepatitis C / I. Emerit [et al.] // *Digestion.* – 2000. – Vol. 62, № 2, 3. – P. 200–207.

88. Emerit, I. Clastogenic factors as potential biomarkers of increased superoxide production / I. Emerit // *Biomark. Insights.* – 2007. – Vol. 2. – P. 429–438.

89. Emerit, I. Superoxide-mediated elastogenesis and anticlastogenic effects of exogenous superoxide dismutase / I. Emerit [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93, № 23. – P. 12799–12804.

90. Emerit, I. Cytogenic methods for detection of oxidative stress and evaluation of antioxidant therapy in hepatitis C infection / I. Emerit // *Hepat. Mon.* – 2011. – Vol. 11, № 6. – P. 434–439.

91. Walla, J.A. Cellular cytogenetic study for treated role of selenium and olive oil as antioxidants against lead poisoning in females mice bone marrow cells / J.A. Walla, F.M. Majdy, J.H. Adel // *Bas. J. Vet. Res.* – 2012. – Vol. 11, № 2. – P. 173–178.

92. Fridovich, I. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases, and related matters / I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 18515–18517.

93. Pushpa-Rekha, T.R. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA cloning and identification of multiple transcription and

translation start sites / T.R. Pushpa-Rekha [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 26993–26999.

94. Maher, P. Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance / P. Maher // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – Vol. 8. – P. 1941–1970.

95. Turnbull, J. Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy / J. Turnbull [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – Vol. 2. – P. 2491–2500.

96. Toye, A.A. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice / A.A. Toye [et al.] // *Diabetologia.* – 2005. – Vol. 48. – P. 675–686.

97. Hagen, T.M. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity / T.M. Hagen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 9562–9566.

98. Okado-Matsumoto, A. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria / A. Okado-Matsumoto, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 38388–38393.

99. Radi, R. Detection of catalase in rat heart mitochondria / R. Radi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266. – P. 22028–22034.

100. Nomura, K. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis / K. Nomura [et al.] // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 351. – P. 183–193.

101. Meister, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency / A. Meister // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol. 1271. – P. 35–42.

102. Green, K. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes / K. Green, M.D. Brand, M.P. Murphy // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – Suppl. 1. – P. S110–S118.

103. Rizzo, A.M. Endogenous antioxidants and radical scavengers / A.M. Rizzo [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 698. – P. 52–67.

104. Griendling, K.K. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies / K.K. Griendling, G.A. Fitz Gerald // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108. – P. 2034–2040.

105. Tang, W.H. Usefulness of myeloperoxidase levels in healthy elderly subjects to predict risk of developing heart failure / W.H. Tang [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2009. – Vol. 103. – P. 1269–1274.

106. Tang, W.H. Clinical and genetic association of serum ceruloplasmin with cardiovascular risk / W.H. Tang [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32. – P. 516–522.

107. Tang, W.H. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk / W.H. Tang [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32. – P. 2803–2812.
108. Ефимцева, Е.А. Параоксоназа: молекулярно-генетические аспекты и клиническое значение / Е.А. Ефимцева, Т.И. Челпанова // *Успехи совр. биологии.* – 2012. – Т. 132, № 3. – С. 282–296.
109. Ashfaq, S. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults / S. Ashfaq // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – Vol. 47. – P. 1005–1011.
110. Rhee, S.G. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases / S.G. Rhee // *IUBMB Life.* – 2001. – Vol. 52. – P. 35–41.
111. Chae, H.Z. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin / H.Z. Chae, S.W. Kang, S.G. Rhee // *Methods Enzymol.* – 1999. – Vol. 300. – P. 219–226.
112. Kang, S.W. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine / S.W. Kang, I.C. Baines, S.G. Rhee // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 6303–6311.
113. Kang, S.W. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine / S.W. Kang, I.C. Baines, S.G. Rhee // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 6303–6311.
114. Wong, C.M. Characterization of human and mouse peroxiredoxin IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species / C.M. Wong [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2000. – Vol. 2. – P. 507–518.
115. Okado-Matsumoto, A. Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions / A. Okado-Matsumoto [et al.] // *J. Biochem.* – 2000. – Vol. 127. – P. 493–501.
116. Park, J.G. Peroxiredoxin 2 deficiency exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice / J.G. Park [et al.] // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 109. – P. 739–749.
117. Kisucka, J. Peroxiredoxin 1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis / J. Kisucka [et al.] // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103. – P. 598–605.
118. Ding, Y. Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice / Y. Ding [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 13. – P. 1477–1490.
119. Guo, X. Overexpression of peroxiredoxin 4 attenuates atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice / X. Guo [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 17. – P. 1362–1375.
120. Yamada, S. Peroxiredoxin 4: critical roles in inflammatory diseases / S. Yamada, Y. Ding, Y. Sasaguri // *J. UOEH.* – 2012. – Vol. 34. – P. 27–39.

121. Revazova, J.A. Antioxidant status and genetic damage: a review of some studies undertaken in Russia [Electronic resource] / J.A. Revazova, L.V. Khripach, F.I. Ingel. – Mode of access: // <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt/article7.htm>. – Date of access: 12.10.2013.
122. Abdelrout, E.R. Genotoxicity and oxidative stress among spray painter / E.R. Abdelrout [et al.] // *Life Sci. J.* – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 20–24.
123. Kadioglu, E. Assessment of individual susceptibility to baseline DNA and cytogenetic damage in a healthy Turkish population: evaluation with lifestyle factors / E. Kadioglu [et al.] // *Gen. Test. Mol. Biomark.* – 2012. – Vol. 16, № 10. – P. 1157–1164.
124. Monteiro, O. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy / O. Monteiro [et al.] // *Life Sci. Med. Mutagen.* – 1999. – Vol. 15, № 1. – P. 69–75.
125. Nashwa, A.A. Clinicopathological and cytogenetic studies on the ameliorative effect of propolis against profenofos toxicity in rats / A.A. Nashwa [et al.] // *Global Veter.* – 2012. – Vol. 9, № 6. – P. 669–682.
126. Fabiola, S. Oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis / S. Fabiola [et al.] // *In vivo.* – 2012. – Vol. 26, № 3. – P. 395–402.
127. Cerutti, P.A. Prooxidant states and tumor promotion / P.A. Cerutti // *Science.* – 1985. – Vol. 227, № 4685. – P. 375–381.
128. Volkova, K. From oxidative DNA damage to molecular epidemiology / K. Volkova, M. Dusluska, A.R. Collins // *J. Appl. Biomed.* – 2006. – Vol. 4. – P. 39–43.
129. Калаев, В.Н. Оценка антропогенного загрязнения районов г. Старый Оскол по цитогенетическим показателям семенного потомства березы повислой / В.Н. Калаев, А.К. Буторина, О.Ю. Шелухина // *Экологич. генетика.* – 2006. – Т. 4, № 2. – С. 9–21.
130. Горячкина, О.В. Цитогенетические реакции хвойных растений в антропогенно нарушенных районах г. Красноярска и его окрестностей / О.В. Горячкина, О.А. Сизых // *Хвойные бореальной зоны.* – 2012. – Т. 30, № 1. – С. 46–51.
131. Коршиков, И.И. Спектр и частота цитогенетических нарушений у проростков семян хвойных как комплексный индикатор влияния техногенно загрязненной среды / И.И. Коршиков, Ю.А. Ткачева, Е.В. Лаптева // *Промышлен. ботаника.* – 2012. – Вып. 12. – С. 135–140.
132. Калаев, В.Н. Цитогенетические реакции лиственных древесных растений на стрессовые условия и перспективы их использования для оценки генотоксичности окружающей среды: автореф. дис. ... докт. биол. наук / В.Н. Калаев; ГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов». – Воронеж, 2009. – 45 с.

133. Talukdar, D. Catalase-deficient mutants in lentil (*Lens culinaris* MEDIK.): perturbations in morpho-physiology, antioxidant redox and cyto-genetic parameters / D. Talukdar, T. Talukdar // Int. J. Agricult. Sci. Research. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 197–212.

134. Сибгатуллина, Г.В. Редокс-метаболизм каллусов гречихи, отличающихся по морфогенной способности: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Г.В. Сибгатуллина; Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН. – Казань, 2011. – 23 с.

135. Обручева, Н.В. Физиология инициации прорастания семян / Н.В. Обручева, О.В. Антипина // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 2. – С. 287–302.

136. Гумилевская, Н.А. Синтез белка и РНК в прорастающих семенах / Н.А. Гумилевская, Л.В. Чумикина, В.Р. Шатилова // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 1. – С. 35–45.

137. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е.Б. Бурлакова [и др.] // Наука. – 1975. – 241 с.

138. Рогожин, В.В. Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестн. Алтайского гос. аграрн. ун-та. – 2011. – № 8. – С. 17–21.

139. Рогожин, В.В. Роль перекисного окисления липидов в прорастании зерновок пшеницы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестн. Алтайского гос. аграрн. ун-та. – 2013. – № 4. – С. 28–32.

140. Ковалева, О.Н. Экофизиологическое влияние на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в сухих семенах ярового ячменя / О.Н. Ковалева // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – № 70, № 6. – С. 2–9.

141. Рогожин, В.В. Об участии оксидоредуктаз в механизмах покоя и прорастания зерновок у пшеницы / В.В. Рогожин, Т.Т. Курилюк, Т.В. Рогожина // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 1. – С. 60–65.

142. Верхотуров, В.В. Физиологические проявления действия окислительного стресса у проростков пшеницы / В.В. Верхотуров, Г.В. Пинигина, О.В. Соколова // Сборник трудов «Проблемные вопр. Восточно-Сибирского рег.». – Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2001. – С. 109–111.

143. Рогожин, В.В. Антиоксидантная система в прорастании семян пшеницы / В.В. Рогожин, В.В. Верхотуров // Известия РАН. Сер., Биол. – 2001. – № 2. – С. 165–173.

144. Верхотуров, В.В. Влияние перекиси водорода на анти- и прооксидантный статус семян ячменя при прорастании / В.В. Верхотуров, В.К. Франтенко // Доклады Российской акад. сельскохоз. наук. – 2008. – № 1. – С. 11–13.

145. Rathore, H.S. Can genotoxic effect be model dependent in *Allium* test? – An Evidence / H.S. Rathore [et al.] // Environment Asia. – 2010. – Vol. 3, № 2. – P. 29–33.

146. Olorunfemi, D.I. Effect of cassava processing effluents on anti-oxidant enzyme activities in *Allium cepa* L. / D.I. Olorunfemi, O. Lolodi // Biokemistri. – 2011. – Vol. 23, № 2. – P. 49–61.

147. Bakare, A.A. In vivo cytogenotoxicity and oxidative stress induced by electronic waste leachate and contaminated well water / A.A. Bakare [et al.] // Challenges. – 2013. – Vol. 4. – P. 169–187.

148. Achary, V.M.M. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. / V.M.M. Achary [et al.] // Ecotox. Env. Saf. – 2008. – Vol. 70. – P. 300–310.

149. Tabrez, S. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India / S. Tabrez, M. Ahmad // Mutat. Res. – 2011. – Vol. 726, № 1. – P. 15–20.

150. Песня, Д.С. Исследование токсического и гепатотоксических эффектов синтетических пищевых красителей методом *Allium test* / Д.С. Песня, А.В. Романовский, П.М. Прохорова // Ярославский пед. вестник. – 2012. – № 3. – Т. III (Естествен. науки). – С. 86–93.

151. Kumar, D.S. Gamma ray induced chromosomal aberrations and enzyme related defense mechanism in *Allium cepa* L. // Cariologia. – 2011. – Vol. 64, № 4. – P. 388–397.

152. Marmat, S. Cytological effects of triphala in *Allium cepa* models / S. Marmat, H.S. Rathore // IJPT. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 5602–5609.

153. Palankumar, L. Chromosome aberrations induced by curcumin and aloin in *Allium cepa* L. root meristem cells / L. Palankumar, I. Ragunathan, N. Panneerselvam // Turk. J. Biol. – 2011. – Vol. 35. – P. 145–152.

154. Sivaraman, K. Attenuation of oxidative stress, inflammation and insulin resistance by *Allium sativum* in fructose-fed male rats / K. Sivaraman [et al.] // J. Clin. Diagn. Res. – 2013. – Vol. 7, № 9. – P. 1860–1862.

155. Ushakova, T. The effect of dietary supplements on gene expression in mice tissues / T. Ushakova [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1996. – Vol. 20, № 3. – P. 279–284.

156. Salil, G. Coconut kernel-derived proteins enhance hypolipidemic and antioxidant activity in alloxan-induced diabetic rats / G. Salil, K.G. Nevin, T. Rajamohan // Int. J. Food. Sci. Nutr. – 2013. – Vol. 64, № 3. – P. 327–332.

157. Salil, G. Arginine-rich coconut kernel diet influences nitric oxide synthase activity in alloxandiabetic rats / G. Salil, K.G. Nevin, T. Rajamohan // J. Sci. Food Agricult. – 2012. – Vol. 92, № 9. – P. 1903–1908.

158. Cheng-Wai, Y. Preventing ultraviolet light-induced damage: the benefits of antioxidants / Y. Cheng-Wai // J. Biol. Educat. – 2007. – Vol. 42, № 1. – P. 40–44.

159. Fernandez-Pachon, M.S. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake / M.S. Fernandez-Pachon [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – Vol. 57, № 15. – P. 6578–6583.

160. Nakamura, Y.K. Lipophilic compound-mediated gene expression and implication for intervention in reactive oxygen species (ROS)-related disease: mini-review / Y.K. Nakamura, S. Omnaye // *Nutrients.* – 2010. – Vol. 2. – P. 725–736.

161. Banerjee, S.K. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic / S.K. Banerjee [et al.] // *Life Sci.* – 2002. – Vol. 70, № 13. – P. 1509–1518.

162. Bensard, D.D. Induction of endogenous tissue antioxidant enzyme activity attenuates myocardial reperfusion injury / D.D. Bensard [et al.] // *J. Surg. Res.* – 1990. – Vol. 49, № 2. – P. 126–131.

163. Zaragova, A. Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defense system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity / A. Zaragova [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1496. – № 2, 3. – P. 183–195.

164. Cao, Z. Induction of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by alpha-lipoic acid in rat cardiac H9C2 cells: protection against oxidative injury / Z. Cao [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 310, № 3. – P. 979–985.

165. Johnston, B. Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including NO / B. Johnston, S. Kanwar, P. Kubes // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 271, № 2. – P. H614–H621.

166. de Carvalho, K. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo / K. de Carvalho [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. – Vol. 40, № 4. – P. 3269–3279.

167. Hernandez, A.F. Modulation of the endogenous antioxidants paraoxoyase-1 and urate by pesticide exposure and genetic variants of xenobiotic-metabolizing enzymes / A.F. Hernandez [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 278–292.

168. Sen, C.K. Antioxidant and redox regulation of gene transcription / C.K. Sen, L. Packer // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10, № 7. – P. 709–720.

169. Al-Alem, U. Functional polymorphisms in endogenous antioxidant defense genes and oxidative stress levels in women: A genotype-phenotype study / U. Al-Alem [et al.] // *Cancer Prev. Res.* – 2009. – Vol. 3, № 12. – P. 1542–1551.

170. Al-Alem, U. Association between functional polymorphisms in antioxidant defense genes and urinary oxidative stress biomarkers in

healthy, premenopausal women / U. Al-Alem [et al.] // *Genes Nutr.* – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. 191–195.

171. Yamaoka, K. Induction of endogenous antioxidant system by low dose radiation and its applicable possibility for treatment of active oxygen species related diseases / K. Yamaoka // *J. Health Sci.* – 2000. – Vol. 11. – P. 2–15.

172. Bronikowski, A.M. Antioxidant gene expression in active and sedentary house mice (*Mus domesticus*) selected for high voluntary wheel-running behavior / A.M. Bronikowski [et al.] // *Genetics.* – 2002. – Vol. 161. – P. 1763–1769.

173. Hackett, N.R. Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers / N.R. Hackett [et al.] // *Am. J. Respir. Cell and Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 29. – P. 331–343.

174. Macdonald, J. Oxidative stress and gene expression in sepsis / J. Macdonald, H.F. Galley, N.R. Webster // *Br. J. Anaesth.* – 2003. – Vol. 90. – P. 221–232.

175. Lim, J. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary / J. Lim, U. Luderer // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol. 84, № 4. – P. 775–782.

176. Da Costa, L.A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress / L.A. Da Costa, A. Badawi, A. El-Sohemy // *Ann. Nutr. Metab.* – 2012. – Vol. 60, Suppl. 3. – P. 27–36.

177. Carlsen, H. Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice / H. Carlsen [et al.] // *J. Nutr.* – 2003. – Vol. 133, № 7. – P. 2137–2140.

178. Moskaug, J. Polyphenols and glutathione synthesis regulation / J. Moskaug [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 81, № 1. – P. 277S–283S.

179. Haddad, J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in regulation of redox(y)-sensitive transcription factors / J.J. Haddad // *Cell. Signal.* – 2002. – Vol. 14. – P. 879–897.

180. Wild, A.C. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses / A.C. Wild, R.T. Mulcany // *Free Radic. Res.* – 2000. – Vol. 32. – P. 281–301.

181. Nioi, P. Identification of novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)Y:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence / P. Nioi [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 374. – P. 344–348.

182. Huang, H.C. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2 / H.C. Yuang, T. Nguyen, C.B. Pickett // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 12475–12480.

183. Лукаткин, А.С. Влияние препарата рибав-экстра на рост и проницаемость мембран проростков кукурузы в условиях температурного стресса / А.С. Лукаткин, Н.Н. Каштанова, Т.А. Котлова // Вестн. Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского. – 2013. – № 1. – С. 151–157.

184. Способ повышения антиоксидантной активности тканей растений: пат. РФ, (13) С1 (51) МПК А01N65/00 (2009.01) А.С. Лукаткин; заявитель Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева. – № 454864 (10.07.2012).

185. Закуцкий, А.Н. Тканеспецифическое влияние синтетических биорегуляторных пептидов в органотипической культуре тканей молодых и старых крыс / А.Н. Закуцкий [и др.] // Успехи геронтологии. – 2006. – Вып. 19. – С. 93–96.

186. Хавинсон, В.Х. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения / В.Х. Хавинсон, В.Г. Морозов. – СПб.: Фолиант, 2001. – 159 с.

187. Khavinson, V. Synthetic tetrapeptide epitalon restores disturbed neuroendocrine regulation in senescent monkeys / V. Khavinson, N. Goncharova, B. Lapin // Neuroendocrinol. Lett. – 2001. – Vol. 22. – P. 251–254.

188. Хавинсон, В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов / В.Х. Хавинсон // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2001. – Т. 132. – С. 228–229.

189. Stahl, Y. Plant Primary Meristems: Shared Functions and Regulatory Mechanisms / Y. Stahl, R. Simon // Curr. Opin. Plant Biol. – 2010. – Vol. 13. – P. 53–58.

190. Wang, G. CLE Peptide Signaling during Plant Development / G. Wang, M. Fiers // Protoplasma. – 2010. – Vol. 240. – P. 33–43.

191. Bahyrycz, A. Plant Signalling Peptides: Some Recent Developments / A. Bahyrycz, D. Konopińska // J. Peptide Sci. – 2007. – Vol. 13. – P. 787–797.

192. Хавинсон, В.Х. Влияние тетрапептида эпифиза на состояние антиоксидантной защиты у *Drosophila melanogaster* / В.Х. Хавинсон, С.В. Мыльников // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2000. – Т. 129. – С. 420–422.

193. Хавинсон, В.Х. Влияние эпиталона на возрастную динамику ПОЛ у *Drosophila melanogaster* / В.Х. Хавинсон, С.В. Мыльников // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2000. – Т. 130. – С. 585–588.

194. Khavinson, V.K. Effect of epitalon on the lifespan increase in *Drosophila melanogaster* / V.K. Khavinson [et al.] // Mech. Ageing Dev. – 2000. – Vol. 120. – P. 141–149.

195. Чиркин, А.А. Продукты распада макромолекул как регуляторы окислительного стресса / А.А. Чиркин // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: материалы III Междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 16–17 апр. 2013 г. / Вит. гос. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2013. – С. 39–41.

196. Чиркин, А.А. Могут ли продукты распада макромолекул служить регуляторами окислительного стресса? / А.А. Чиркин // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы X Междунар. конф., 17–18 мая 2013 г. – Минск: «Издательский центр БГУ», 2013. – С. 371–373.

197. Чиркин, А.А. Окислительный стресс: биологические и медицинские проблемы / А.А. Чиркин // Артериальная гипертензия и профилактика сердечно-сосудистых заболеваний: материалы VII Междунар. конф., Витебск, 23–24 мая 2013 г. – Витебск, 2013. – С. 81–85.

198. Ушкалова, Е.А. Антиоксидантные и антигипоксические свойства актовегина у кардиологических больных / Е.А. Ушкалова // Трудный пациент. – 2005. – № 3. – С. 20–24.

199. Гусев, Е.И. Нейропротективная терапия ишемического инсульта. Вторичная нейропротекция / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2002. – № 6. – С. 3–18.

200. Денисова, С.И. Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда / С.И. Денисова [и др.] // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2007. – № 1(43). – С. 143–149.

201. Коваленко, Е.И. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) / Е.И. Коваленко [и др.] // Учен. записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6, № 43. – С. 248–266.

202. Горецкая, М.В. Влияние экстракта куколок шелкопряда на функциональную активность нейтрофилов / М.В. Горецкая [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 2. – С. 25–30.

203. Чиркин, А.А. Антиоксидантные эффекты гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда при моделировании окислительного стресса в клетках человека / А.А. Чиркин [и др.] // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2009. – № 3(53). – С. 152–158.

204. Коваленко, Е.И. Изменение активности нейтрофилов крови человека при взаимодействии с компонентами жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда в условиях *in vitro* / Е.И. Коваленко [и др.] // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 3. – С. 21–26.

205. Мартинович, Г.Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г.Г. Мартинович, С.Н. Черенкевич. – Минск: БГУ, 2006. – 154 с.

206. Решетников, В.Н. Морфогенный потенциал длительно пасируемых каллусных культур *Nicotiana tabacum* / В.Н. Решетников [и др.] // Бюллетень Никитского бот. сада. – Ялта, 2009. – Вып. 99. – С. 103–107.

207. Бакакина, Ю.С. Влияние высокотемпературного стресса на внутриклеточную концентрацию NO и эндогенное содержание цГМФ в проростках *Arabidopsis thaliana* / Ю.С. Бакакина, Л.В. Дубовская, И.Д. Волотовский // Весн. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2009. – № 4. – С. 34–39.

208. Volotovski, I.D. Ca<sup>2+</sup> and intracellular signalling in plant cells: a role in phytochrome transduction / I.D. Volotovski // Membr. Cell Biol. – 1998. – Vol. 12, № 5. – P. 721–742.

209. Ляхнович, Г.В. Влияние света на метаболизм фосфоинозитидов эндоплазматического ретикулума этиолированных проростков овса / Г.В. Ляхнович, И.Д. Волотовский // Физиол. раст. – 2000. – Т. 47, № 1. – С. 37–42.

210. Ламан, Н.А. Современная технология предпосевной обработки семян и ее биологические основы / Н.А. Ламан, Г.Н. Алексейчук, Ж.Н. Калацкая // Наука и инновации. – 2006. – № 9. – С. 37–41.

211. Хроматографический анализ аминокислот и пептидов на сферических смолах и его применение в биологии и медицине / Дж. Бенсон, Дж. Патерсон. – Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М., 1974. – С. 9–84.

212. Lowry, O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

213. Количественное определение витаминов в биологических объектах и поливитаминные препараты // Здоровье и окружающая среда / А.А. Подолинская [и др.] // Сб. науч. тр., вып. 11. – Минск: БелСАинформ «Сиэлтон», 2009. – С. 172–177.

214. Dipierro, S. The Ascorbate System and Lipid Peroxidation in Stored Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers / S. Dipierro, S.D. Leonardis // J. Exp. Bot. – 1997. – Vol. 48. – P. 779–783.

215. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот / И.Д. Стальная // Совр. методы в биох. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.

216. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

217. Радюк, М.С. Изменение активности глутатионредуктазы в зеленых листьях ячменя под влиянием катионов Cd<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup> / М.С. Радюк [и др.] // Весн. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2007. – № 2. – С. 71–74.

218. Чевари, С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

219. Мазур, Т.В. Вторичные метаболиты растений-генерантов *Agastache rugosa* (Fisch. Et Mey.) / Т.В. Мазур, В.Н. Решетников,

Т.И. Фоменко // Весн. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2008. – № 4. – С. 5–9.

220. Узбеков, Г.А. Определение аминного азота в белках и аминокислотах калориметрическим нингидринным методом / Г.А. Узбеков // Вопр. мед. химии. – 1958. – Т. 4. – С. 69.

221. Шлык, А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154–170.

222. Экология листогрызущих насекомых / В.А. Радкевич. – Минск: Наука и техника, 1980. – 239 с.

223. Словарь-справочник энтомолога / С.П. Белошапкин [и др.], сост. Ю.А. Захваткин, В.В. Исаичев. – М.: Нива России, 1992. – 334 с.

224. Daniel, A.H. Energetics of insect diapause / A.H. Daniel, D.L. Denlinger // Ann. Rev. Entomol. – 2012. – Vol. 56. – P. 103–121.

225. Lees, A.D. The physiology and biochemistry of diapause / A.D. Lees // Ann. Rev. Entomol. – 1956. – Vol. 1. – P. 1–16.

226. Tauber, M.J. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development / M.J. Tauber, C.A. Tauber // Ann. Rev. Entomol. – 1976. – Vol. 21. – P. 81–107.

227. Denlinger, D.L. Regulation of diapause / D.L. Denlinger // Ann. Rev. Entomol. – 2002. – Vol. 47. – P. 93–122.

228. Биология развития: в 3 т.; пер. с англ. / С. Гилберт. – М.: Мир, 1995. – Т. 3. – 352 с.

229. Основы физиологии насекомых / В.П. Тыщенко. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1976. – Ч. 1: Физиология метаболических систем. – С. 30; С. 219–256.

230. Zhou, J. Proximate, amino acid and mineral composition of pupae of the silkworm *Antheraea pernyi* in China / J. Zhou, D. Han // J. Food composition and analysis. – 2006. – Vol. 19, № 8. – P. 850–853.

231. Zhou, J. Safety evaluation of protein of silkworm (*Antheraea pernyi*) pupae / J. Zhou, D. Han // Food Chem. Toxicol. – 2006. – Vol. 44, № 7. – P. 1123–1130.

232. Longvah, T. Nutrient composition and protein quality evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae / T. Longvah, K. Mangthya, P. Ramula // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 128. – P. 400–403.

233. Pan, W.-J. Supercritical carbondioxide extraction of oak silkworm (*Antheraea pernyi*) pupal oil: process optimization and composition determination / W.-J. Pan [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13. – P. 2354–2367.

234. Трокоз, В.А. Стимуляція фізіологічних процесів у організмі тварин біологічно активними речовинами різного походження: автореф. дис. ... докт. сільськогосподарських наук: 03.00.13 / В.А. Трокоз;

Львівські національному університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2013. – 48 с.

235. Трокоз, В.А. Биологически активные продукты из дубового шелкопряда: аспекты использования с лечебно-профилактической целью / В.А. Трокоз [и др.] // Сборник тезисов 2 Всероссийской конф. по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных. – М., 2006. – С. 21–28.

236. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью: пат. 12504 Респ. Беларусь, МПК (2006) А61К35/56 / М.В. Горецкая, В.М. Шейбак, А.А. Чиркин; заявитель Гродненский гос. ун-т. – № а 20070709; заявл. 2007.06.11; опубл. 2009.02.28 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2009. – № 5. – С. 57.

237. Средство для снижения уровня гомоцистеина при гипергомоцистеинемии: пат. Респ. Беларусь № 12608, МПК (2006) А61К35/56 / А.В. Наумов, Е.М. Дорошенко, В.М. Шейбак [и др.]; заявитель Гродненский гос. ун-т. – № а 20070851; заявл. 2007.07.07; опубл. 2009.02.28 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2009. – № 6. – С. 62–63.

238. Li, Y.P. Construction of a full-length cDNA library from Chinese oak silkworm pupa and identification of a KK-42-binding protein gene in relation to pupa-diapause termination / Y.P. Li [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 5, № 5. – P. 451–457.

239. Теоретические основы разведения китайского дубового шелкопряда в Беларуси / С.И. Денисова. – Минск: УП «Технопринт», 2002. – 234 с.

240. Экология листогрызущих насекомых / В.А. Радкевич. – Минск: Наука и техника, 1980. – 239 с.

241. Чиркин, А.А. Аминокислотный состав препаратов солянки холмовой и их применение для коррекции возрастных изменений метаболизма / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, В.М. Шейбак // Вестник фармации. – 1998. – № 4. – С. 24–30.

242. Chirkin, A.A. Oak silkworm pupae hemolymph (*Antheraea pernyi* G.-M.) as biopharmaceutical raw material for antioxidant and cytomodulating drugs // Korea-Belorus Science and Technological seminar, Proceedings, 25 October, 2010. Belarus, Minsk. – 10 p.

243. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность гемолимфы куколок дубового шелкопряда при моделировании окислительного стресса в клетках человека / А.А. Чиркин [и др.] // Экологическая антропология. Ежегодник / Ин-т истории НАН Беларуси; редкол.: Л.И. Тегачо [гл. ред.]. – Минск: Бел. комитет «Дети Чернобыля». – Минск, 2019. – С. 61–65.

244. Чиркин, А.А. Антиоксидантное действие гомогената расплода пчел / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.В. Зайцев // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2012. – № 2(68). – С. 24–28.

245. Чиркин, А.А. Биохимия онтогенеза и филогенеза: учеб. пособие / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, С.Б. Бокуть; под ред. проф. А.А. Чиркина. – Минск: Инфра-М, 2012. – 288 с.

246. Chirkin, A.A. Determination of a insulin-like effect of extract *Salsola Collina* by means of epididynal liposytes and regenerating hepatocytes / A.A. Chirkin [et al.] // Exper. and toxicologic pathology. – 1996. – Vol. 48, № 5. – P. 342.

247. Chirkin, A.A. Apoptosis, necrosis and hepatotropic preparations / A.A. Chirkin, E.O. Danchenko, R. Dargel // Medical Science, Internat. Med. J. Experim. Clin. Research., 1999. – Vol. 5. – Suppl. 1. – P. 109–115.

248. Чиркин, А.А. Аминокислотный состав определяет фармакодинамику экстракта солянки холмовой / А.А. Чиркин [и др.] // Аминокислоты и их производные в биологии и медицине: материалы 2 Международ. научн. конф., Гродно. – 2001. – С. 112–113.

249. Чиркин, А.А. Аминокислотный спектр природных гепатотропных препаратов / А.А. Чиркин [и др.] // Лекарственные средства и биологически активные соединения: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Гродно, 2007. – С. 187–188.

250. Чиркин, А.А. Диагностика, лечение и профилактика сердечно-сосудистых заболеваний (опыт медиков Белорусской железной дороги) / А.А. Чиркин, В.В. Шваренок, Э.А. Доценко. – Минск: ОДО «Триолета», 2003. – 394 с.

251. Zheng, W. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs / W. Zheng, S.Y. Wang // J. Agric. Food. Chem. – 2001. – Vol. 49, № 11. – P. 5165–5170.

252. Костюк, В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 174 с.

253. Iozanov-Stankov, O. Determination of total antioxidant status (TAS) as a biochemical parameter in control of workers health / O. Iozanov-Stankov [et al.] // Arch. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 61, № 3. – P. 375–382.

254. Horrocks, N.P.C. The silkmoth cocoon as humidity trap and waterproof barrier / N.P.C. Horrocks, F. Vollrath, D. Cedric // Comparative biochemistry and physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2013. – Vol. 154, № 4. – P. 645–652.

255. Nuchadomrong, S. Antibacterial and antioxidant activities of sericin powder from eri silkworm cocoons correlating to degumming processes / S. Nuchadomrong // Int. J. Wild Silkmoth and silk. – 2009. – Vol. 13. – P. 69–78.

256. Senakoon, W. Antibacterial action of eri (*Samia ricini*) sericin against echerichia coli and staphylococcus aureus / W. Senakoon // As. J. Food. Ag-Ind. – 2009. – Special Issue. – P. S222–S228.

257. Xian-ming, Q.U. Insect immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the chinense oak silk moth, *Antheraea pernyi* / Q.U. Xian-ming // Eur. J. Biochem. – 1982. – Vol. 127. – P. 219–224.

258. Prasong, S. Screening of antioxidant activity of some *Samia ricini* (Eri) silks: comparison with *Bombyx mori* / S. Prasong // J. Biol. Sci. – 2011. – Vol. 11, № 4. – P. 336–339.

259. Zhou, J. Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice / J. Zhou [et al.] // FASEB J. – 2008. – Vol. 22, № 7. – P. 2569–2578.

260. 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.

261. Franco, R. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation / R. Franco, M. Panayiotidis, J. Cidlowski // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, № 42. – P. 30452–30465.

262. Miller, R.A. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance / R.A. Miller [et al.] // Aging Cell. – 2005. – Vol. 4, № 3. – P. 119–125.

263. Трокоз, В.А. Способ получения лечебного экстракта // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).

264. Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Учен. записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 248–265.

265. Hristova, M. GSH-dependent regulation of Fas-mediated caspase-8 activation by acrolein / M. Hristova, S. Heuvelmans, A. van der Vliet // FEBS Lett. – 2007. – Vol. 581, № 3. – P. 361–367.

266. Dai, J. Immunoregulatory effects of homocysteine on cardiovascular diseases / J. Dai, X. Wang // Sheng Li Xue Bao. – 2007. – Vol. 59, № 5. – P. 585–592.

267. Grimble, R.F. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans / R.F. Grimble // J. Nutr. – 2006. – Vol. 136, № 6. – P. 1660S–1665S.

268. Hote, P.T. Ethanol inhibits methionine adenosyltransferase II activity and S-adenosylmethionine biosynthesis and enhances caspase-3-dependent cell death in T lymphocytes: relevance to alcohol-induced immu-

nosuppression / P.T. Hote [et al.] // J. Nutr. Biochem. – 2008. – Vol. 19, № 6. – P. 384–391.

269. Van Brummelen, R. L-methionine as immune supportive supplement: a clinical evaluation / R. Van Brummelen, D. du Toit // Amino Acids. – 2007. – Vol. 33, № 1. – P. 157–163.

270. Michalek, R.D. The requirement of reversible cysteine sulfenic acid formation for T cell activation and function / R.D. Michalek [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 179, № 10. – P. 6456–6467.

271. Ergun, M.A. Investigating the *in vitro* effect of taurine on the infant lymphocytes by sister chromatid exchange / M.A. Ergun [et al.] // Pediatr. Int. – 2006. – Vol. 48, № 3. – P. 284–286.

272. Lefkovits, I. Quantitative proteomics of lymphocytes / I. Lefkovits // Comp Funct Genomics. – 2003. – Vol. 4, № 5. – P. 531–536.

273. Jani, T.S. Inhibition of methionine adenosyltransferase II induces FasL expression, Fas-DISC formation and caspase-8-dependent apoptotic death in T leukemic cells / T.S. Jani [et al.] // Cell Res. – 2008. – № 12. – P. 147–155.

274. Attia, R.R. Selective targeting of leukemic cell growth *in vivo* and *in vitro* using a gene silencing approach to diminish S-adenosylmethionine synthesis / R.R. Attia [et al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, № 45. – P. 30788–30795.

275. Hadzic, T. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion / T. Hadzic [et al.] // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175, № 12. – P. 7965–7972.

276. Midwinter, R.G. IkappaB is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: inhibition of NF-kappaB activity by glycine chloramine through methionine oxidation / R.G. Midwinter [et al.] // Biochem J. – 2006. – Vol. 396, № 1. – P. 71–78.

277. Emerson, D.K. Taurine monochloramine activates a cell death pathway involving Bax and Caspase-9 / D.K. Emerson, M.L. McCormick, J.A. Schmidt, C.M. Knudson // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, № 5. – P. 3233–3241.

278. Peskin, A.V. Chlorine transfer between glycine, taurine, and histamine: reaction rates and impact on cellular reactivity / A.V. Peskin, R.G. Midwinter, D.T. Harwood, C.C. Winterbourn // Free Radic Biol. Med. – 2005. – Vol. 38, № 3. – P. 397–405.

279. Ogino, T. Oxidative modification of IkappaB by monochloramine inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation / T. Ogino [et al.] // Biochim. et Biophys. Acta. – 2005. – Vol. 1746, № 2. – P. 135–142.

280. Turowski, P. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration / P. Turowski [et al.] // J. Cell Sci. – 2008. – Vol. 121 (Pt. 1). – P. 29–37.

281. Толмачева, Н.А. Регулятор роста растений «Рибав-Экстра» / Н.А. Толмачева, Т.Г. Михеева // *Соврем. технологии и перспективы использования средств защиты растений, регуляторов роста, агрохимикатов в агроландшафтном земледелии.* – 2008. – С. 123–127.
282. Справочник по биохимии / Ф.Л. Калинин, В.П. Лобов, В.А. Жидков. – Киев: Навук. думка, 1971. – 764 с.
283. Биологические функции каротиноидов / В.Н. Карнаухов. – М.: Наука, 1988. – 240 с.
284. Булда, О.В. Спектрофотометрический метод определения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов / О.В. Булда, В.В. Рассадина, Г.Н. Алексейчук, Н.А. Ламан // *Методы исследований.* – 2008. – Т. 55, № 4. – С. 604–611.
285. Maiorino, M. Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation / M. Maiorino // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 330, № 2. – P. 174–177.
286. Ward, J.A. Should antioxidant vitamins be routinely recommended for older people? / J.A. Ward // *Drugs & Aging.* – 1998. – Vol. 12, № 3. – P. 169–175.
287. Kutushov, M. Low concentrations of Rhodamine-6G selectively destroy tumor cells and improve survival of melanoma transplanted mice / M. Kutushov, O. Gorelik // *Neoplasma.* – 2013. – Vol. 60, № 3. – P. 262–273.
288. Войников, В.К. Физиологический стресс и регуляция активности генома клеток эукариотов / В.К. Войников, Г.Г. Иванова // *Успехи совр. биологии.* – 1988. – Т. 105, № 1. – С. 3–14.
289. Войников, В.К. Белки теплового шока растений / В.К. Войников, Г.Г. Иванова, А.В. Гудиковский // *Физиол. раст.* – 1984. – Т. 31, № 2. – С. 970–979.
290. Войников, В.К. Синтез белков в растениях при действии низких температур / В.К. Войников, Г.Г. Иванова, М.В. Корытов // *Физиол. и биохим. культ. раст.* – 1986. – Т. 18, № 3. – С. 211–222.
291. Altschuller, M. The synthesis of heat-shock and normal proteins at high temperatures in plants and their possible roles in survival under heat stress / M. Altschuller, J.P. Mascarenhas // *Heat Shock from Bacteria to Man.* – 1982. – P. 321–327.
292. Mackerness, S.A.H. Effect of supplementary ultraviolet p-radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light level in pea (*Pisum sativum* L.): role of active oxygene species and antioxidante enzymes / S.A.H. Mackerness, S.Z. Surplus, B.R. Jordan // *Photochem. Photobiol.* – 1998. – Vol. 68, № 1. – P. 88–96.
293. Kimpel, J.A. Heat shock in plants / J.A. Kimpel, J.L. Key // *Trends in Biochem. Sci.* – 1985. – Vol. 10, № 9. – P. 353–357.

294. Физиолого-генетические аспекты устойчивости растений к тяжелым металлам. Аналитический обзор / В.С. Барсукова. – Новосибирск: «ГПНТБ СО РАН», 1997. – 63 с.

295. Hall, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance / J.L. Hall // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53, № 366. – P. 1–11.

296. Lombi, E. Cadmium accumulation in population of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense* / E. Lombi, F.J. Zhao, S.J. Dunham, S.P. McGrath // *New Phytol.* – 2000. – Vol. 145. – P. 11–20.

297. Meharg, A.A. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloids and potential biotechnological applications / A.A. Meharg // *Plant Soil.* – 2005. – Vol. 274. – P. 163–174.

298. Morel, J.L. Measurement of  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots / J.L. Morel, M. Mench, A. Guckert // *Biol. Fertil. Soils.* – 1986. – Vol. 2. – P. 29–34.

299. Иванова, Е.М. Биологические эффекты высоких концентраций меди и цинка и характер их взаимодействия в растениях рапса / Е.М. Иванова, В.П. Холодова, Вл.В. Кузнецов // *Физиол. раст.* – 2010. – Т. 57, № 6. – С. 864–873.

300. Taylor, G.J. Exclusion of metals from the symplasm: a possible mechanism of metal tolerance in higher plants / G.J. Taylor // *J. Plant Nutr.* – 1987. – Vol. 10, № 9/16. – P. 1213–1222.

301. Wagner, G.J. Accumulation of cadmium in crop plants and consequences to human health / G.J. Wagner // *Adv. Agron.* – 1993. – Vol. 51. – P. 173–212.

302. Culter, J.M. Characterization of cadmium uptake by plant tissue / J.M. Culter, D.W. Rains // *Plant Physiol.* – 1974. – Vol. 54, № 1. – P. 67–71.

303. Novakova, M.  $Cd^{2+}$  effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.) / M. Novakova, E. Matejova, D. Sofrova // *Photosynthetica.* – 2004. – Vol. 42, № 3. – P. 425–430.

304. Prasad, M.N. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants / M.N. Prasad // *Environ. Exp. Bot.* – 1995. – Vol. 35. – P. 525–545.

305. Kwak, S.N. Assembly and function of AsGlu2 fibrillar multimer of oat beta-glucosidase / S.N. Kwak [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1794. – P. 526–531.

306. Lee, K.H. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid / K.H. Lee [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – P. 1109–1120.

307. Mazzuca, S. Cell and tissue localization of beta-glucosidase during the ripening of olive fruit by in situ activity assay / S. Mazzuca, A. Spadafora, A.M. Innocenti // *Plant Sci.* – 2006. – Vol. 171. – P. 726–733.

308. Wang, X. Phospholipase D in hormonal and stress signaling / X. Wang // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 5. – P. 408–414.

309. Xuemin, W. Regulatory Functions of Phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses / W. Xuemin // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139. – P. 566–573.

310. Yanovsky, M.J. Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in Arabidopsis: weak de-etiolation of the phyA mutant under dense canopies / M.J. Yanovsky, J.J. Casal, G.C. Whitelam // *Plant Cell Environ.* – 1995. – Vol. 18. – P. 788–794.

311. Яронская, Е.Б. Действие 5-аминолевулиновой кислоты на рост и содержание фотосинтетических пигментов в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / Е.Б. Яронская, Т.В. Дрозд, Н.В. Шальго, Н.Г. Аверина // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2006. – № 4. – С. 77–80.

Научное издание

**ТОЛКАЧЕВА** Татьяна Александровна

**ГИСТОЛИЗ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА**

Монография

Технический редактор *Г.В. Разбоева*  
Корректор *А.Н. Фенченко*  
Компьютерный дизайн *Л.Р. Жигунова*

Подписано в печать . . . . . 2015. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 7,91. Уч.-изд. л. 7,03. Тираж . . . . . экз. Заказ . . . . .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Свидетельство о государственной регистрации в качестве издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/255 от 31.03.2014 г.

Отпечатано на ризографе учреждения образования  
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.