



УДК 577.3'32/36:577.334

А.А. Чиркин, И.Б. Заводник, Е.И. Коваленко,
Е.Ю. Судникович, С.В. Забродская, Д.И. Паршенок

Антиоксидантные эффекты
гемолимфы куколок китайского
дубового шелкопряда
при моделировании окислительного
стресса в клетках человека

В 2007 году было описано антиоксидантное действие водного экстракта куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) [1]. Известны многочисленные повреждающие эффекты активных форм кислорода на молекулярном (окисление белков, пероксидное окисление липидов, повреждение ДНК), клеточном (нарушение трансдукции клеточного сигнала, влияние на экспрессию генов) и тканевом уровнях (развитие патологий, старение). Неспецифическая окислительная модификация клеточных структур представляет один из наиболее потенциально опасных процессов для клетки. Токсическое действие свободных радикалов на жизнедеятельность клетки привело к формированию мощной многоуровневой системы антиоксидантной защиты. Генерация радикалов в клетке определяется ее метаболической активностью, концентрацией кислорода, доступностью ионов переходных металлов, уровнем клеточных восстановителей [2].

Удобными клеточными моделями для исследования механизмов окислительного повреждения являются эритроциты и нейтрофилы крови человека. Эритроциты – высоко специализированные клетки крови, лишенные аппарата синтеза белка, и, следовательно, возможности репарации возникающих повреждений, циркулирующие в сосудистом русле в течение 120 дней при постоянной высокой концентрации кислорода и содержащие высокие концентрации ионов переходных металлов (ионы железа гемоглобина). В качестве модельного окислительного агента для мембран эритроцитов широко используется органическая гидроперекись – *tert*-бутил гидроперекись (tBOOH).

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

Цель настоящей работы – исследовать возможную антиоксидантную активность гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда, используя эритроциты и нейтрофилы крови человека.

Методы исследования. Эритроциты здоровых доноров, полученные на станции переливания крови, трижды промывали изотоническим забуференным раствором соли (PBS: 0,145 M NaCl, 19 mM NaH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) и после удаления слоя лейкоцитов использовали в виде суспензии с гематокритом 5% в PBS.

Нейтрофилы изолировали из периферической крови здоровых людей разделением в градиенте плотности фиколл-урографина.

Окислительные повреждения эритроцитов: tBOOH использовали в виде свежеприготовленного 100 mM раствора в PBS. Необходимое количество окислителя (1 и 2 mM) вносили в суспензию эритроцитов. Гемолимфу помещали в суспензию эритроцитов непосредственно перед внесением окислителя. Концентрацию образовавшихся стабильных продуктов пероксидного окисления мембранных липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), определяли спектрофотометрически по методу Stocks and Dormandy, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Внутриклеточную концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли спектрофотометрически по методу Элмана. Использовали значение молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{412} = 1,36 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Суммарную генерацию активных форм кислорода нейтрофилами регистрировали методом люминол-опосредованной хемилюминесценции. Отдельно анализировали формирование клетками O₂^{•-} и H₂O₂ по интенсивности люцигенин-опосредованной хемилюминесценции.

Результаты и обсуждение. Регистрировали в эритроцитах человека окисление внутриэритроцитарного восстановленного глутатиона и пероксидное окисление мембранных липидов, индуцируемое внесением tBOOH в отсутствие и в присутствии различных концентраций гемолимфы. При этом использовали гемолимфу, предварительно разбавленную в 5 раз и стабилизированную фенолтиомочевинной, и непосредственно выделенную из куколки шелкопряда без разведения. Некоторые параметры, характеризующие состав и свойства гемолимфы, представлены в табл.

Таблица

Параметры, характеризующие антиоксидантный статус гемолимфы куколок шелкопряда в зависимости от кормовой базы

Корм, листья	Белок, мг/мл	Низкомолекулярные свободные тиолы, M	ТБКРС, нмоль/мг белка	Глутатион-пероксидаза, нмоль GSH/мин×мг белка
Дуб	55±4	~10 ⁻⁶	0,35±0,6	42±9
Береза	29,5±3	~10 ⁻⁶	0,16±0,5	13±2

Одновременно методом тонкослойной хроматографии в гемолимфе верхнего сегмента куколки обнаружены соединения, способные к окислительно-восстановительным превращениям, предположительно, гидрохиноны. В то же время концентрация низкомолекулярных тиолов была низкой.

Инкубация эритроцитов с tBOOH привела к образованию продуктов пероксидного окисления мембранных липидов и окислению эритроцитарного глутатиона. Внесение предварительно разбавленной гемолимфы эффективно ин-

гибировало окислительные процессы в эритроцитах, уровень образующихся продуктов перексидного окисления липидов уменьшался на 55% (рис. 1).

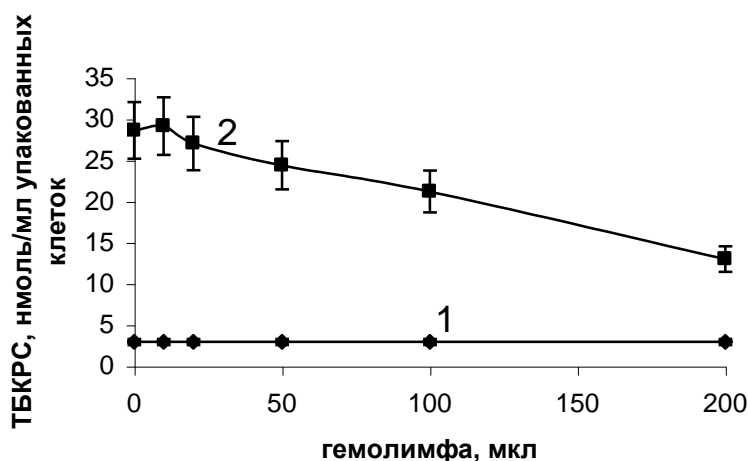


Рис. 1. Эффект гемолимфы на процесс перексидного окисления липидов эритроцитов человека:

PBS, 37°C, 1 mM tBOOH, время экспонирования эритроцитов – 30 мин. Использовали раствор гемолимфы, разбавленный в 5 раз. 1 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в отсутствии tBOOH; 2 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в присутствии tBOOH.

Одновременно гемолимфа предотвращала ферментативное окисление восстановленного глутатиона в глутатионпероксидазной реакции (рис. 2).

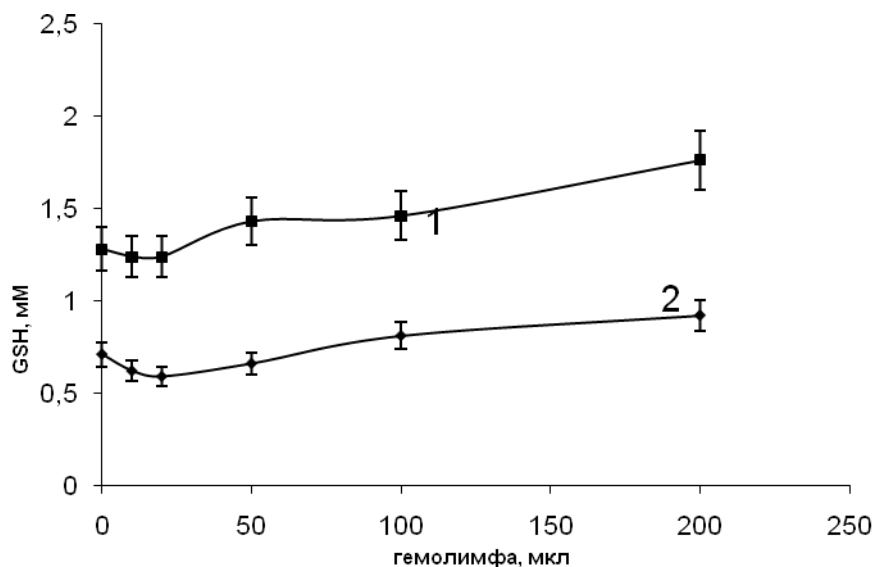


Рис. 2. Эффект гемолимфы на процесс окисления глутатиона в эритроцитах человека:

PBS, 37°C, время экспонирования эритроцитов с окислителем – 30 мин. Использовали раствор гемолимфы, разбавленный в 5 раз. 1 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в присутствии 1 mM tBOOH; 2 – эритроциты инкубировали с гемолимфой в присутствии 2 mM tBOOH.

Уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах, подвергнутых действию окислителя (1 мМ tBOOH) в присутствии гемолимфы, был на 38% выше, нежели в отсутствие протектора. Еще более выраженным антиоксидантным эффектом обладала гемолимфа шелкопряда, непосредственно извлеченная из куколки. Гемолимфа более чем на 65% ингибировала процесс генерирования продуктов пероксидного окисления липидов в эритроцитах в присутствии 2 мМ tBOOH (рис. 3). Известно, что индуцируемое органическим пероксидом окислительное повреждение эритроцитов связано с генерацией алкоксильного и пероксильного радикалов в реакции окислителя с оксигемоглобином. Можно предположить, что компоненты гемолимфы непосредственно взаимодействуют с образующимися радикалами либо ингибируют процесс их образования.

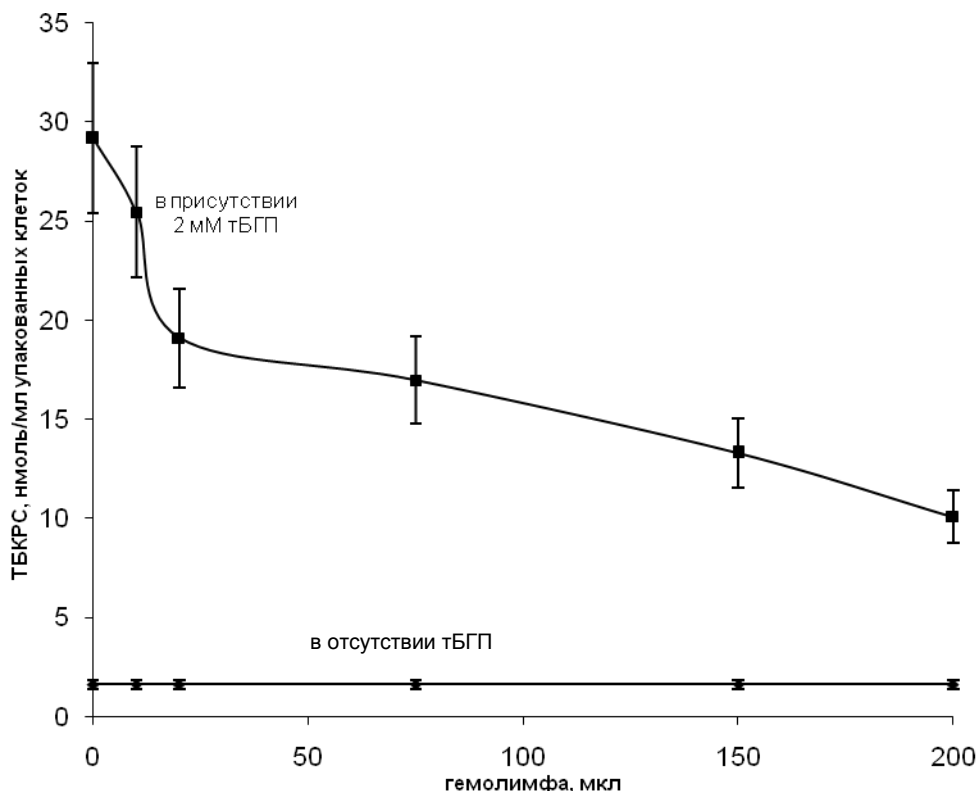


Рис. 3. Эффект гемолимфы, непосредственно извлеченной из куколки шелкопряда (верхний сегмент), на процесс пероксидного окисления липидов в эритроцитах человека:

PBS, 37°C, 2 мМ tBOOH, время экспонирования эритроцитов – 30 мин. Эритроциты инкубировали с гемолимфой в отсутствие tBOOH и в присутствии tBOOH.

Обнаружено, что *in vitro* водный экстракт гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда, полученный по методу [5], оказывал ингибирующее влияние на образование активных форм кислорода в нейтрофилах, определяемое по люминол-опосредованной хемилюминесценции, что свидетельствует о его антиоксидантном действии. Ингибирование генерации активных форм кислорода обнаружено при стимуляции нейтрофилов хемотаксическим

пептидом fMet-Leu-Phe, индуктором фагоцитоза латексом и в процессе адгезии (рис. 4).

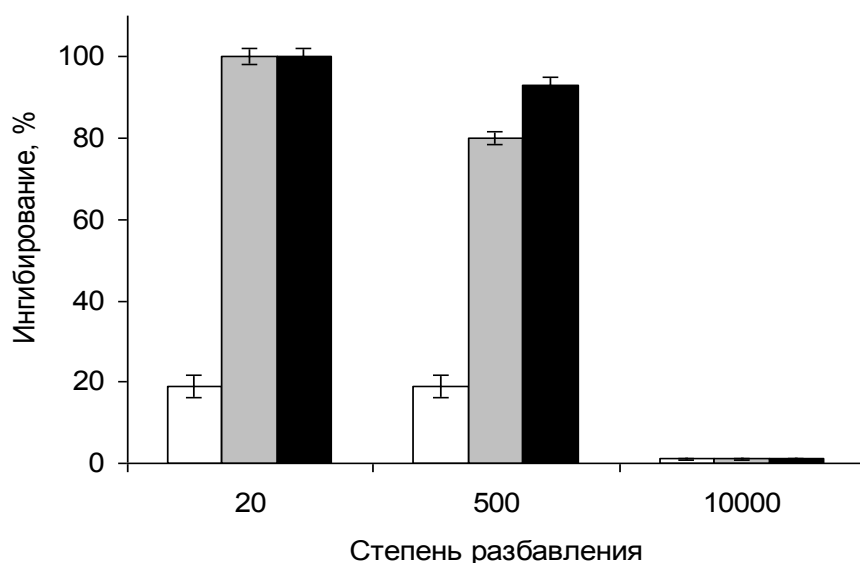


Рис. 4. Ингибирующее действие водного экстракта куколок на люминол-опосредованную хемилюминесценцию стимулированных нейтрофилов: □ – клетки стимулированы в ходе адгезии к стеклу; ■ – при действии латекса; ■ – при действии fMet-Leu-Phe. По оси абсцисс – степень разбавления водного экстракта куколок после его внесения в реакционную среду. Указан 95% доверительный интервал. n=3. pH 7,3, содержание нейтрофилов – 2 млн/мл.

В специальных экспериментах была изучена способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода после предварительного инкубирования клеток с водным экстрактом гемолимфы куколок в течение 40 мин при 37°C и последующей отмывки клеток. Оказалось, что способность формировать активные формы кислорода у нейтрофилов, инкубированных без экстракта, и клеток, инкубированных с экстрактом, а затем отмытых от несвязанных компонентов экстракта, практически не различается. Это свидетельствует о том, что компоненты водного экстракта гемолимфы куколок не сорбируются клетками и не приводят к снижению способности клеток генерировать активные формы кислорода в ответ на стимуляцию. По-видимому, компоненты экстракта не проникают внутрь клеток и контролируют реакции, происходящие с участием миелопероксидазы нейтрофилов, во внеклеточном пространстве.

Для оценки уникальности выявленного антиоксидантного эффекта у гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда был произведен поиск аналогичной активности гемолимфы виноградных улиток (*Helix pomatia L.*). На рис. 5 представлены данные о влиянии гемолимфы на генерацию активных форм кислорода стимулированными нейтрофилами человека. Установлено, что ингибирующее действие гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда проявляется при больших разведениях по сравнению с гемолимфой виноградных улиток.

На рис. 6 представлены данные, показывающие наличие значительно более выраженного антиоксидантного эффекта гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда по сравнению с гемолимфой виноградных улиток на модели окисления люминола бесклеточными системами.

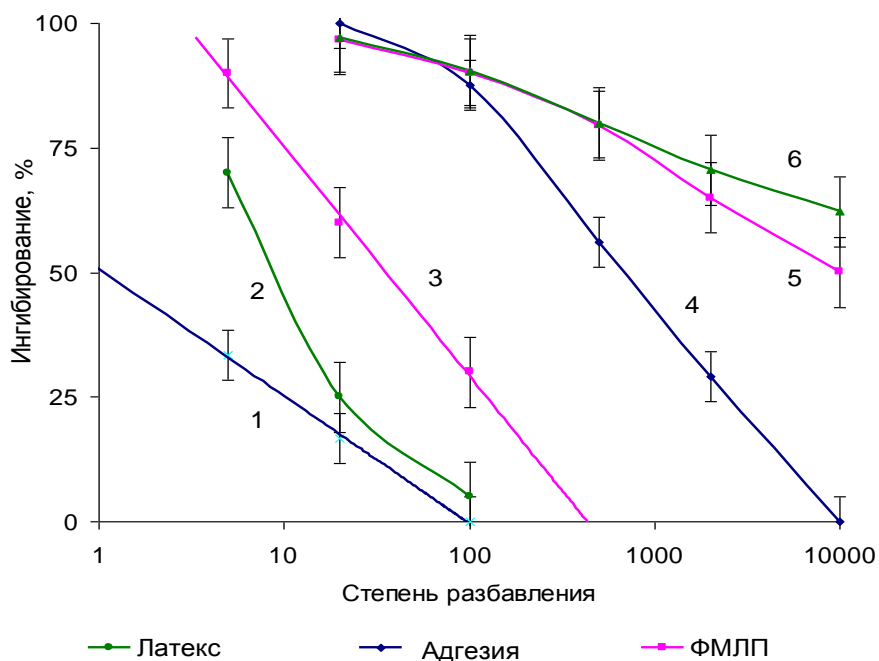


Рис. 5. Влияние гемолимфы виноградных улиток и куколок шелкопряда на генерацию активных форм кислорода нейтрофилами, стимулированными в ходе адгезии (1, 4), при действии хемотаксического пептида fMet-Leu-Phe (3, 5) и индуктора фагоцитоза латекса (2, 6). (1–3 – гемолимфа улиток, 4–6 – гемолимфа куколок шелкопряда).

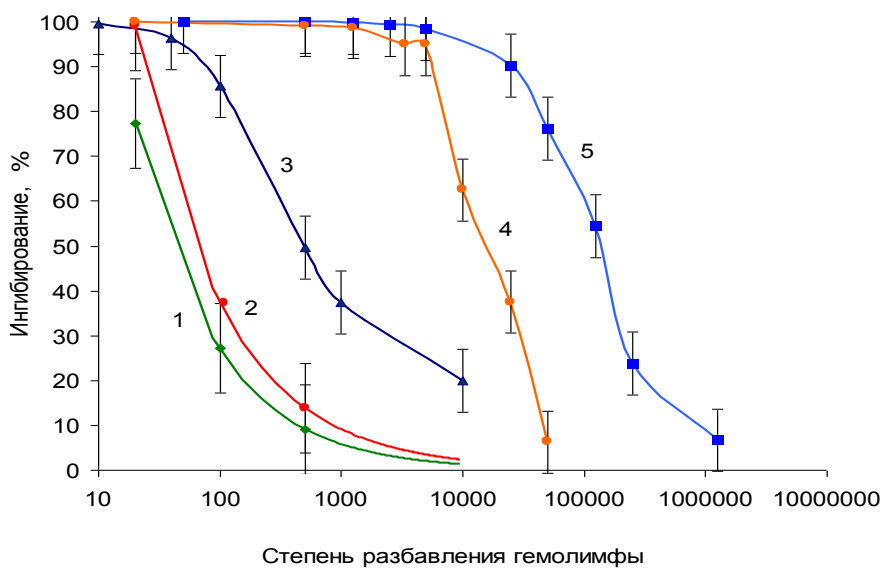


Рис. 6. Влияние гемолимфы виноградных улиток и куколок шелкопряда на окисление люминола при действии NOCl (3, 5), пероксидазы хрена с пероксидом водорода (2, 4), миелопероксидазы нейтрофилов с H₂O₂ (1). (1–3 – гемолимфа улиток, 4–5 – гемолимфа куколок шелкопряда).

При вычислении 50% ингибирования образования активных форм кислорода показано, что гемолимфа куколок китайского дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + НОСІ в 200 раз, люминол + миелопероксидаза хрена + H₂O₂ – в 200 раз, генерации активных форм кислорода 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. Следовательно, ингибирующее действие гемолимфы шелкопряда наблюдается при степени ее разбавления на несколько порядков более высокой, чем у виноградных улиток.

Полученные результаты позволяют рекомендовать гемолимфу исследуемого эукариотического организма – куколок китайского дубового шелкопряда или ее компоненты в качестве препаратов, повышающих антиоксидантный статус и предотвращающих развитие повреждений клеток и тканей при патологических состояниях, связанных с окислительным стрессом.

Работа поддержана грантом БРФФИ Б09-154 от 15.04.2009 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Чиркин, А.А.** Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) / А.А. Чиркин [и др.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 248–265.
2. **Sies, H.** Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. – London: Academic Press, 1991. – P. 15–22.
3. **Nathan, C.** Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities // Nat. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 6. – P. 173–182.
4. **Aratani, Y.** Role of Myeloperoxidase in the Host Defense against Fungal Infection // Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. – 2006. – Vol. 47, № 3. – P. 195–199.
5. **Трокоз, В.А.** Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз [и др.] // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).

S U M M A R Y

In experiments simulating the oxidative stress in human erythrocytes with tert-butyl hydroperoxide, as well as in neutrophils during adhesion, the action of chemotactic peptide fMet-Leu-Phe and latex, an antioxidant activity of aqueous extract of Chinese oak silkworm pupae hemolymph is show. Antioxidant effect of Chinese oak silkworm pupae hemolymph is manifested when it is diluted by several orders of magnitude higher than similar effects of grape snails' hemolymph.

Поступила в редакцию 27.06.2008