

Влияние экстракта куколок шелкопряда на функциональную активность нейтрофилов

М.В. Горецкая, В.М. Шейбак, А.А. Чиркин

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Витебский государственный университет им. П.М.Машерова

The impact of silkworm pupae extract on the functional activity of neutrophils

M.V. Goretskaja, V.M. Sheybak, A.A. Chirkin

Grodno State Medical University

Vitebsk State University

Аннотация

Экстракты из куколок китайского дубового шелкопряда, которые не содержат белков, оказывают иммуномодулирующее действие на клетки системы иммунитета. Экстракты из куколок стимулируют функциональную активность нейтрофилов крови и одновременно подавляют функциональную активность нейтрофилов брюшной полости. На основе экстрактов из куколок китайского дубового шелкопряда возможно создание иммуномодулирующих фармацевтических препаратов.

Ключевые слова

Экстракт куколок шелкопряда, нейтрофилы

Известно, что основной функций нейтрофилов является фагоцитоз чужеродных объектов. При этом происходит усиление обмена веществ по глюкозомонофосфатному пути с активацией внутриклеточного дыхания (респираторного взрыва). Нейтрофилы быстро отвечают на различные раздражители и активируются под влиянием фагоцитированных частиц или клеток, агрегированных иммуноглобулинов, иммунных комплексов, компонентов комплемента, хемокина ИЛ-8, лектинов и других митогенов [1]. Средний срок циркуляции нейтрофилов в крови 6-9 часов, а в тканях 2-3 дня, после чего они подвергаются апоптозу. Количество нейтрофилов увеличивается при гнойной инфекции, их число снижается при некоторых ви-

Summary

Extracts of Chinese oak silkworm pupae, which do not contain proteins, have immunomodulatory effect on the immune system cells. Extracts pupae functional activity stimulates blood neutrophil and simultaneously suppresses functional activity of neutrophils abdominal cavity of rats. It is anticipated that, based on extracts of Chinese oak silkworm pupae possible to create immunomodulatory pharmaceuticals.

Key words

Extracts of Chinese oak silkworm pupae

русных заболеваний, действию токсических веществ, в том числе некоторых лекарственных средств, влияющих на гранулопоэз. Функционирование нейтрофилов может существенно изменяться под влиянием самых различных факторов, что делает их одним из важнейших участников иммуногенеза.

Исследования показали, что куколки дубового шелкопряда являются эффективным источником многих биологически активных веществ [2, 3]. Ранее нами было показано, в опытах *in vitro* экстракт куколок избирательно ингибировал образование активных форм кислорода с участием миелопероксидазы нейтрофилов. В последующем было доказано его антиоксидантное действие, способность ингибировать

пероксидазную и галогенирующую активность миелопероксидазы нейтрофилов, связывать свободные анионы гипохлорита и пероксинитрита, но, при этом экстракт не ингибировал образование супероксида НАДФН-оксидазой [4].

Целью работы явилось изучение влияния экстракта куколок китайского дубового шелкопряда на функциональную активность нейтрофилов.

Материалы и методы

В работе были использованы экстракт из цельных куколок китайского дубового шелкопряда, приготовленный согласно разработанной инструкции (ЭК) [3] и водный экстракт из гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда (ГЛ). Оба препарата не содержат белков; ЭК дозируется разведением, а ГЛ дозируется содержанием суммы аминокислот в 1 мл препарата. Для достижения поставленной цели проведены эксперименты *in vitro* и *in vivo*.

In vitro. В круглодонных пластиковых планшетах инкубировали в течение часа в равных объемах цельную кровь, ЭК или ГЛ и взвесь стафилококка (однодневная культура *Staphylococcus aureus* P-209 – музейный штамм кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга). ЭК добавляли в следующих разведениях: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000; а ГЛ – в дозах 0,1 мкг/мл и в 0,01 мкг/мл. В контрольные пробы вместо экстракта вносили физиологический раствор. После инкубации готовили мазки. Окрашивали по Романовскому-Гимзе. Производили подсчет числа нейтрофилов, захвативших в процессе фагоцитоза три и более стафилококков, в процентах (фагоцитарное число – ФЧ), количество поглощенных стафилококков каждым нейтрофилом (фагоцитарный индекс – ФИ).

In vivo. 1. В эксперименте за трое суток до декапитации крысам-самкам массой 180-200 г однократно внутрибрюшинно вводили ГЛ в дозе 100 мг/кг. За 2-3 мин перед резкой крысам внутрибрюшинно вводили 10 мл раствора Хенкса с гепарином. Отбирали перитонеальную жидкость с резидентными и мигрировавшими в очаг стерильного воспаления клетками. Для исследования брали кровь с гепарином (25 Ед/мл) и перитонеальную жидкость. Ставили реакции оценки фагоцитоза. Через час определяли фагоцитарное число и фагоцитарный индекс.

2. ГЛ вводили внутрижелудочно в дозе 100 мг/кг, один раз в день в течение 10 суток крысам массой 55-75 г. Контрольным животным

осуществляли введение физиологического раствора в аналогичном режиме. Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом, через 24 ч после последнего введения экстракта. Для исследования брали кровь с гепарином (25 Ед/мл). Ставили реакции оценки фагоцитоза. Через час определяли фагоцитарное число и фагоцитарный индекс.

3. ЭК вводили двукратно внутрижелудочно в разведении 1:10 в объеме 1мл/200 г массы, через день один раз в сутки крысам массой 180-200 г. Контрольным животным осуществляли введение физиологического раствора в аналогичном режиме. Животные были декапитированы под легким эфирным наркозом, через 24 ч после заключительного введения экстракта. Для исследования брали кровь с гепарином (25 Ед/мл). Ставили реакции оценки фагоцитоза, и проводили НСТ-тест. Через час определяли фагоцитарное число и фагоцитарный индекс.

Результаты и обсуждение

ГЛ шелкопряда содержит свободные и незаменимые аминокислоты в концентрации ≈ 15 г/л. По данным литературы известно, что аминокислоты оказывают иммуномодулирующее действие на отдельные показатели системы иммунитета. Так, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, триптофан обладают достаточно выраженными иммуностимулирующими свойствами. Лизин, лейцин, аргинин стимулируют фагоцитоз [5, 6].

В таблице 1 представлены данные об изменении фагоцитарной активности нейтрофилов крови при культивировании *in vitro* с дозами ГЛ 0,1 мкг/мл и 0,01 мкг/мл и ЭК в различных разведениях.

Из таблицы 1 видно, что ГЛ в дозе 0,1 мкг/мл оказывал заметный стимулирующий эффект на фагоцитарную активность нейтрофилов. Так, фагоцитарное число достоверно увеличилось на 22%, а фагоцитарный индекс – на 64% по сравнению с контрольными значениями. Десятикратное снижение дозы ГЛ (0,01 мкг/мл) не приводило к существенному сдвигу фагоцитарной активности. Фагоцитарная активность нейтрофилов достоверно возросла под действием экстракта в разведении 1:10. Максимальное количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе составило 95%, минимальное – 78%, что в среднем равно $88,3 \pm 1,8\%$. Поглотительная способность данных нейтрофилов также достоверно увеличилась. Наибольшее число захваченных

стафилококков нейтрофилами составило $\approx 17,5$. Следует отметить, что даже минимальные показатели индекса $\approx 11,7$ превышали контрольные максимальные значения ($\approx 11,5$). В среднем фагоцитарный индекс был на 43% выше контрольных значений. ЭК в разведении 1:100 также вызвал достоверное увеличение фагоцитарного числа на 11%. Самые низкие значения числа нейтрофилов участвующих в фагоцитозе – 87%, превышали максимальные контрольные значения – 86%. Фагоцитарный индекс достоверно повысился на 31% относительно контрольных значений. Следовательно, ЭК в разведении 1:10 в большей степени повышает поглотительную способность нейтрофилов, тогда как ЭК в разведении 1:100 – фагоцитарную активность, т.е. число нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе (таблица 1). При исследовании разведе-

ний ЭК 1:1000 и 1:10000 не выявлено достоверных изменений относительно контрольных значений изучаемых показателей.

При вычислении фагоцитарного коэффициента выявили достоверное увеличение его при использовании ЭК в разведениях 1:10 и 1:100. Минимальные показатели коэффициента в этих группах одинаковые (20,2-20,3) и в 1,6 раз превышали контрольные значения (12,5), тогда как максимальные значения оказались выше при разведении экстракта 1:10 и составляли 37,4 (таблица 2). Обнаружен достоверный стимулирующий эффект разведений 1:10 (на 71,9% превышает контрольные значения) и 1:100 (на 48,3%). Коэффициенты разведений 1:1000 и 1:10000 практически в равном процентном отношении отличались от контроля, но эффект был разнонаправленным. При первой

Таблица 1

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

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

Примечание: * - достоверно ($p < 0,05$) относительно контрольных значений

Таблица 2

Дозозависимые изменение фагоцитарного коэффициента нейтрофилов крови крыс

Показатели	Фагоцитарный коэффициент	min	max
Контроль	$17,3 \pm 1,15$	12,50	23,70
ЭК 1:10	$29,8 \pm 2,28^*$	20,20	37,40
ЭК 1:100	$25,7 \pm 1,66^*$	20,30	35,10
ЭК 1:1000	$18,8 \pm 0,88$	14,60	22,70
ЭК 1:10000	$16,9 \pm 0,42$	16,10	18,00

дозе – тенденция к стимуляции, второй – тенденция к супрессии.

В таблице 3 представлены данные по функциональной активности нейтрофилов крови и перитонеальной жидкости крыс. На 4-е сутки, после однократного внутрибрюшинного введения гемоимфы, при оценке фагоцитарной активности отмечено достоверное увеличение фагоцитарного числа на 20% по сравнению с контрольными значениями. Одновременно наблюдали достоверное повышение фагоцитарного индекса на 70%.

В перитонеальных фагоцитах отмечали выраженную тенденцию к снижению фагоцитарного индекса на 21% и фагоцитарного числа на 10%. Таким образом, однократное внутрибрюшинное введение ГЛ вызвало разнонаправленный эффект в отношении функциональной активности нейтрофилов. А именно: в крови фагоцитоз нейтрофилов усиливался, в то время как в перитонеальной полости – снижался.

В дальнейших исследованиях изучали фагоцитарную активность нейтрофилов крови после десятикратного введения гемолимфы в дозе 100 мг/кг. В результате эксперимента отметили достоверное увеличение как фагоцитарного числа с $69,7 \pm 1,45\%$ до $82,2 \pm 2,74\%$ (на 23%), так и фагоцитарного индекса с $8,50 \pm 0,38$ до $11,4 \pm 0,91$ (на 34%) по сравнению с контрольными значениями.

Нами проведена нагрузка нейтрофилов животных контрольной группы ЭК *in vitro* в разведении 1:10 (таблица 4). В результате количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе составило $91,0 \pm 3,0\%$, что на 20% выше уровня контроля. Поглотительная способность нейтрофилов также возросла на 36% и составила $13,6 \pm 0,75$. Следовательно, ЭК в разведении 1:10 оказывает стимулирующий эффект с нейтрофилами крови как в тестах *in vitro*, так и *in vivo*.

Введение ЭК в разведении 1:10 внутрибрюшинно один раз в сутки через день привели к

Таблица 3

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

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

Таблица 4

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

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

достоверному увеличению функциональной активности нейтрофилов крови. Так, фагоцитарное число повысилось на 15%, фагоцитарный индекс возрос на 46% и поглотительный коэффициент увеличился на 43% относительно контрольных значений. Функциональная активность фагоцитов перитонеальной жидкости фактически не изменилась, хотя можно отметить тенденцию к снижению исследуемых показателей - фагоцитарный индекс понизился на 29%.

Метаболическую активность нейтрофилов определяли в тесте восстановления нитросинего тетразолия. Известно, что НСТ-тест характеризует степень активации глюкозо-6-фосфатного пути и связанное с ним обра-

зование свободных радикалов кислорода. Спонтанный НСТ-тест отражает степень функциональной активности клеток *in vivo*, а индуцированный - функциональный резерв клетки и позволяет судить о нарушениях в бактерицидной системе фагоцитов. В таблице 5 представлены данные изменения спонтанной и стимулированной зимозаном реакции при введении внутрибрюшинно ЭК. Очевидно, что ЭК способствовал достоверному повышению как спонтанной, так и стимулированной реакции.

В тестах *in vitro* ЭК практически не уступал препарату сравнения - зимозану (таблица 6), то есть повышал функциональную активность нейтрофилов крови.

Таблица 5

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

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

Таблица 6

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

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

Примечание: ЗМ - зимозан

Таким образом, ЭК и ГЛ оказывают иммуномодулирующее действие на клетки иммунной системы. Эффект отмечается как в тестах *in vitro*, так и в тестах *in vivo*. Положительный результат *in vivo* наблюдали и при различных способах введения - внутрижелудочном и внутрибрюшинном. Очевидно, что экстракт куколок стимулирует функциональную активность нейтрофилов крови и одновременно подавляет активность нейтрофилов перитонеальной полости. В этом проявляется модулирующий эффект экстракта. Нами не обнаружено принципиальных раз-

личий в действии экстракта приготовленного двумя способами и содержащего различные компоненты куколок (в случае ЭК экстрагируются соединения, входящие в состав гемолимфы куколки). Следовательно, экстракт куколок шелкопряда обладает иммуномодулирующей активностью и разнонаправлено влияет на функциональную активность иммунокомпетентных клеток, что позволяет предполагать возможность создания на его основе лекарственного препарата широкого спектра действия, одним из компонентов которого будет являться иммуностимуляция.

Литература

1. Новиков Д.К. Медицинская иммунология. Мн.: Выш. шк., 2005, 301 с.
2. Денисова С.И. и др. Реакция китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) на воздействие ксенобиотиков в зависимости от кормового растения. Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова» 2007, т. 6: 267-286.
3. Трокоз В.А. Способ получения лечебного экстракта. Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).
4. Чиркин А.А., Коваленко Е.И., Шейбак В.М. и др. Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.). Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова» 2007, т. 6: 248-265.
5. Белокрылов Г.А. и др. Различия действия пептидов и составляющих их аминокислот на иммунный ответ и фагоцитоз у мышей. Иммунология, 1991; №5: 46-48.
6. Шейбак В.М., Тис А.А., Шейбак Л.Н. Фагоцитарная активность нейтрофилов пуповинной крови новорожденных *in vitro* в присутствии лейцина. Эксп. и клин. фармакология 2005; №1: 48-49.