

Характеристика жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда

Б.Н. Кочергин, Н.А. Степанова, Т.А. Толкачева, А.А. Чиркин

Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

В результате проведенных многолетних исследований показано, что содержание общего белка в гемолимфе куколок составляет $55 \pm 4,0$ г/л, а содержание свободных аминокислот – 4,6 г/л. В гемолимфе обнаружен полный набор протеиногенных аминокислот, включая все незаменимые аминокислоты. Общее содержание растворимых белков в теле куколки и жировом теле было наибольшим при питании гусениц листьями ивы. В гемолимфе куколок дубового шелкопряда содержание аскорбиновой кислоты больше в десять раз по сравнению с гемолимфой виноградных улиток. На протяжении диапаузы в гемолимфе увеличивается количество калия и мочевой кислоты. В первой четверти диапаузы гистолиз происходит с помощью механизмов апоптоза. В этот период гемолимфа способна вызывать апоптоз в стволовых клетках жировой ткани крыс. Доказано наличие ингибирующих и активирующих субстанций в составе гемолимфы. Высказано предположение об их ключевой роли в чередовании процессов гистолиза и гистогенеза в фазе диапаузы. Разработан способ получения препарата из куколок дубового шелкопряда для профилактики инсулинорезистентности.

Ключевые слова: дубовый шелкопряд, гемолимфа, диапауза, гистолиз, гистогенез, биохимический состав.

Characteristics of the liquid contents of the oak silkworm pupae

B.N. Kochergin, N.A. Stepanova, T.A. Tolkacheva, A.A. Chirkin

Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

As a result of long term research it is presented that the total content of protein in the haemolymph of pupae is $55 \pm 4,0$ g/l, and free amino acid content is 4,6 g/l. A complete set of proteinogenic amino acids, including all essential amino acids, is found in haemolymph. The total content of soluble proteins in the body of pupae and in the fat body was highest when feeding caterpillars with leaves of willow. In silkworm oak pupae haemolymph the content of ascorbic acid is ten times as much as in snail haemolymph. During diapause the amount of potassium and uric acid increases in haemolymph. In the first quarter of diapause gistolysis occurs through the mechanisms of apoptosis. During this period, haemolymph can induce apoptosis in adipose tissue stem cells of rats. We proved the presence of inhibitory and activating substances in the composition of haemolymph. The assumption of their key role in the alternation of processes of gistolysis and gistogenesis in the phase of diapause, is made. Method for producing drug from oak silkworm pupae for the prevention of insulin resistance is worked out.

Key words: oak silkworm, haemolymph, diapause, gistolysis, histogenesis, biochemical composition.

У насекомых с полным превращением личинка последнего возраста трансформируется в куколку. Куколка дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) покрыта оболочкой из шелковой нити (кокон). По массе кокон дубового шелкопряда значительно превосходит (в 2–3 раза) кокон тутового шелкопряда. Средняя масса живых коконов колеблется в пределах 4,5–9 г, сухих – 2–3 г. Процентное содержание оболочки в коконе дубового шелкопряда достигает 28%, у тутового – 42%. Фаза куколки у дубового шелкопряда (диапауза) продолжается 7–8 месяцев. Куколка не питается, а живет за счет энергии пищи, потребляемой личинкой. В куколке происходят процессы гистолиза и гистогенеза. Гистолиз – разрушение подлежащих замене в ходе

метаморфоза тканей и органов личинки, которое осуществляется при помощи автолиза, лейкоцитоза (с помощью лейкоцитов) и фагоцитоза. Гистолизу подвергаются все системы организма личинки, кроме нервной, половой, а также спинного сосуда [1–3]. Жидкое содержимое куколки дубового шелкопряда в дальнейшем изложении будем называть гемолимфой куколки. В периоде диапаузы не происходит разрушение молекул гемолимфы в результате свободнорадикальных процессов, и содержимое куколок защищено от бактериальной контаминации. Гистолиз сменяется гистогенезом, конечной целью которого является построение из жидкого содержимого куколок новых, имагинальных органов. Важную роль при гистогенезе играют

имагинальные зачатки – группы клеток, из которых возникают те или иные ткани и органы. Таким образом, 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 [4–5]. В работе 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 им. П.М. Машерова [1–2]. Целью работы было изучение механизма гистолиза при окукливании и оценка биохимического состава гемолимфы куколок дубового шелкопряда.

Материал и методы. Содержание белка определяли по Лоури. Диск-электрофорез белков гемолимфы осуществляли в полиакриламидном геле. Фракционирование гемолимфы проводили методом колоночной хроматографии на сефадексе G25 fine. Собирали фракции объемом по 3 мл. Содержание аминокислот в гемолимфе анализировали одноколоночным методом по модифицированному методу J.V. Benson, J.A. Paterson. Количественную и качественную идентификацию свободных аминокислот и их дериватов во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда проводили обращенно-фазной 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, pH 9,4 (дериватирующий раствор смешивали с пробой в соотношении 6:1); 2) последующая дериватизация аминокислот с вторичным атомом азота (пролина и оксипролина) 9-флуоренилметилкарбомойлхлоридом (FМОС), 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 pH,

после чего ее немедленно вводили в хроматограф. Вся процедура дериватизации осуществлялась автоматически с помощью автосамплера Agilent 1200, который термостатировали при 5°C. В работе применяли колонку Zorbax XDB C₈, 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, pH 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. Идентификацию и количественную оценку полученных значений осуществляли с помощью программы Agilent ChemStation B.04.02 путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот. Динамику биохимических показателей гемолимфы в процессе диапаузы изучали с помощью тест-систем сухой химии (анализатор «Рефлотрон IV»). Содержание витаминов в гемолимфе определяли общепринятыми флуоресцентными и спектрофотометрическими методами.

Жизнеспособность клеток жирового тела и гемолимфы оценивали методом культивирования. Для культивирования клеток жирового тела использовали модифицированные Дульбекко среды Игла (DMEM) с различными добавками. Производили окраску ядер клеток с помощью флуоресцентного красителя Хехст-33342 (по 10⁻⁵ М) или красителей Хехст-33342 и йодистый пропиций (по 10⁻⁵ М). Исследовали влияние фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащих аминокислоты и пептиды, на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани крыс (ЖТК). Использовали окраску CFSE: МСК ЖТК крысы, полученные трипсинизацией 3-го пассажа при конфлюэнтности ≈75%, ресуспендировали до концентрации 10⁶ клеток/мл в ФСБ с добавкой 10% ЭТС и 7мМ CFSE. CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) – это вещество, известное также под названием CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), представляет собой флуоресцентную метку, способную проникать в клетку, сохраняться в ней в процессе развития, передаваться дочерним клеткам. Регистрация результатов проводилась на проточном цитофлуориметре Beckman-Coulter FC 500. Полученный цифровой материал обработан статистически с использованием критерия t Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Белки и аминокислоты гемолимфы куколок. Данные о содержании растворимых белков в теле гусениц (фаза личинки) и куколки представлены в табл. 1. 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 гистоллизом 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).

Данные о влиянии вида корма (дуб черешчатый и береза повислая) на содержание растворимых белков в тканях гусениц и куколки приведены в табл. 2.

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 отно-

сительной электрофоретической подвижности растворимых белков гемолимфы куколок дубового шелкопряда найдена 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 гемолимфы куколок дубового шелкопряда методом гelfильтрации на колонке с сефадексом G25 fine были выявлены три группы веществ: 1) макромолекулы (белки и нуклеиновые кислоты, фракции 7–13, элюционный объем 21–39 мл); 2) пептиды и нуклеотиды (фракции 15–30, элюционный объем 45–90 мл); 3) низкомолекулярные биорегуляторы (фракции 34–52, элюционный объем 102–156 мл). При повторных разделениях различных образцов гемолимфы на колонке с сефадексом G25 fine хроматографические профили элюции были достаточно близкими. Предположение о наличии трех групп веществ вытекает из анализа данных оптической плотности фракций при определенных длинах волн (210, 260 и 280 нм). Содержание некоторых веществ во фракциях гемолимфы представлено на рис. 1.

Таблица 1

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: ¹ – $P < 0,05$ по сравнению с гусеницей I возраста; ² – $P < 0,05$ по сравнению с гусеницей V возраста.

Таблица 2

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	$59,0 \pm 5,53$	$30,3 \pm 2,78^1$	$53,8 \pm 5,24$
Кишечник, г/кг	$21,1 \pm 2,12$	$36,4 \pm 3,76^1$	$41,0 \pm 4,10^1$
Гемолимфа куколки, г/л	$48,3 \pm 2,34$	$33,5 \pm 3,17^1$	$34,1 \pm 2,98^1$
Тело куколки, г/кг	$121 \pm 5,6$	$98,9 \pm 3,54^1$	$157 \pm 8,12^1$
Жировое тело, г/кг	$40,9 \pm 2,25$	$32,2 \pm 1,75^1$	$62,3 \pm 5,64^1$

Примечание: ¹ – $P < 0,05$ по сравнению с данными столбца «Листья дуба».

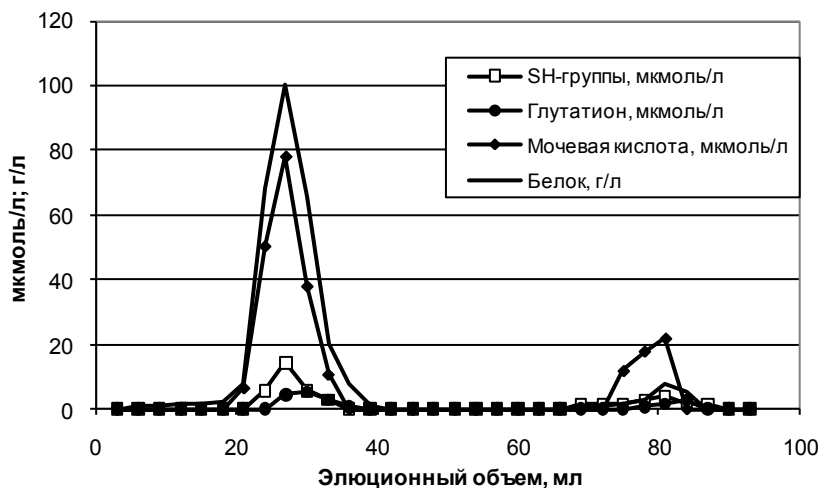


Рис. 1. Результаты хроматографического разделения гемолимфы на сефадексе G25 fine – некоторые химические компоненты фракций гемолимфы.

Таблица 3

Содержание антиоксидантных витаминов в гемолимфе (мкг/мл)

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

Примечание: ¹ – P<0,05.

Из анализа данных рис. 1 видно, что белок регистрируется в первом пике (фракции 7–13, элюционный объем 21–39 мл). Кроме того, следы белка находятся также во фракциях 22–29 (элюционный объем 66–87 мл). В первых двух пиках выявляются SH-группы, глутатион и мочевая кислота. Возможно, что в первом пике выходят ассоциированные с белком трипептид глутатион и мочевая кислота. Третий пик, вероятно, содержит низкомолекулярные биорегуляторы фенольной природы, триптофан, биофлавоноиды и другие вещества. Это подтверждается методом тонкослойной хроматографии на силикагеле – выявлено наличие нескольких флуоресцирующих компонентов гемолимфы (система п-бутанол: уксусная кислота: вода = 4:1:5), являющихся дигидроксикинонами. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в гемолимфе куколок и ее фракциях не удалось обнаружить антиоксидант ресвератрол. Однако, содержание продуктов пероксидного окисления липидов (ТБК-положительные вещества) 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.

Общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколок китайского дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л, в том числе обнаружен 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 [6]. 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 специфичных для насекомых белков и стероидов и других липофильных биорегуляторов).

Биохимические изменения в гемолимфе куколок на протяжении диапаузы. Содержание антиоксидантных витаминов в гемолимфе куколок дубового шелкопряда по сравнению с гемолимфой виноградных улиток (*Helix pomatia* L.) представлено в табл. 3.

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

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

Из табл. 3 следует, что в гемолимфе куколок дубового шелкопряда содержание аскорбиновой кислоты превышает таковое 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 ($\bar{X} \pm \sigma$, мкг/мл) витамин В₁ (0,011±0,011), витамин В₂ (17,9±6,19), пировиноградная кислота (71,6±11,9), 4-пиридоксильная кислота (0,69±0,062) [7].

На протяжении диапаузы происходит переход от процессов гистолиза к процессам гистогенеза, что проявляется в виде изменений биохимического состава гемолимфы (табл. 4).

Для сравнения в табл. 4 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. На наш взгляд, это может относиться и к другим биологическим жидкостям, в частности, к гемолимфе куколок дубового шелкопряда. По крайней мере, 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 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 едва ли может 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. 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 гамма-глутамилтрансферазы 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 белков до пептидов и аминокислот (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.

Роль апоптоза при формировании куколок.

Считают, что в физиологических условиях процессы автолиза играют важную роль в развитии организма и дифференцировке клеток. Эти представления возникли до того, когда удалось расшифровать механизмы апоптоза и установить различия между апоптозом и некрозом. В связи с этим была изучена роль апоптоза в процессе гистолиза тканей гусеницы V возраста и превращения ее в куколку. Экстракт куколок дубового шелкопряда обычно получают в сентябре–октябре месяцах года, т.е. в первой четверти диапаузы. Поэтому представляло существенный интерес: 1) оценить жизнеспособность клеток (включая стволовые клетки) содержимого куколок и 2) выявить особенности влияния гидрофильных компонентов куколок на культивирование стволовых клеток.

На первом этапе работы исследовали жизнеспособность клеток жирового тела и гемолимфы методом культивирования. При выполнении первого этапа работы установлено, что окраска Хехст-33342 клеток гемолимфы, инкубировавшихся 6 суток, выявила в большинстве клеток картину апоптоза (пикнотические или фрагментированные ядра). При окраске комбинацией красителей (Хехст-33342 и йодистый пропидий – стандартный метод оценки жизнеспособности) клеток гемолимфы, инкубировавшихся 2 суток, обнаружено красное (характерное для нежизнеспособных) свечение ядер у всех наблюдавшихся клеток, при этом морфология ядра у большинства была апоптотической. Значительная часть клеток находилась в составе агрегатов. Из гемолимфы и жирового тела куколок дубового шелкопряда удалось выделить клетки, прикрепляющиеся к культуральному пластику. Однако состояние большинства из этих клеток характеризовалось гибелью по механизмам апоптоза.

Следовательно, в первой четверти диапаузы куколок дубового шелкопряда выявились признаки продолжающегося гистолиза по механизмам апоптоза, что может обогащать гемолимфу продуктами распада клеток.

На втором этапе работы исследовали влияние среднелекулярных (пептидных) фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда в разведениях 1:10 и 1:100 на пролиферацию и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы. Показано, что во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда содержатся пептиды, подавляющие жизнедеятельность стволовых клеток. Итак, гистолиз продолжается в первой четверти диапаузы куколок дубового шелкопряда и включает два основных процесса: 1) интенсивную гибель резидентных и циркулирующих клеток по механизмам апоптоза и 2) действие веществ пептидной природы, подавляющих жизнеспособность стволовых клеток [8].

Наряду с теоретической значимостью, выявленные особенности ранней диапаузы куколок дубового шелкопряда имеют очевидное практическое значение, поскольку в процессе гистолиза формируется жидкое содержимое куколок, включающее строительные и энергетические материалы для построения эукариотических клеток, а также формируются системы антиоксидантной защиты содержимого куколок от окислительного стресса и способы подавления функционирования стволовых клеток. Молекулы, обеспечивающие эти процессы, представляют интерес для биотехнологии фармацевтических субстанций в связи с их оптимизированным соотношением и биосовместимостью с эукариотическими клетками.

Разделение ингибирующей и активирующей синтез ДНК активностей в гемолимфе куколок дубового шелкопряда. В предварительных экспериментах по проращиванию семян различных растений было обнаружено, что обработка только высокими разведениями водного экстракта куколок дубового шелкопряда ($1:10^4 - 1:10^5$) оказывает стимулирующее действие на прорастание семян фасоли, бобов, гороха и подсолнечника. Можно полагать, что стимулирующие эффекты экстракта в относительно малых разведениях ($1:10 - 1:10^3$), вероятно, маскируются какой-то ингибирующей субстанцией. В больших разведениях эффект ингибирования снимается и проявляется стимулирующее действие экстракта. Оптимальные результаты были получены при обработке семян экстрактом, содержащим 7–70 мкг/л альфа-аминоазота.

В последующих 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 и низкомолекулярные биорегуляторы. Были исследованы цитотоксичность (МТТ-тест) и влияние каждой фракции на синтез ДНК (включение меченного тимидина в ДНК культивируемых клеток Нер G-2). Вначале было изучено цитотоксическое действие фракций гемолимфы на рост трансформированных клеток. Наиболее убедительные результаты были получены при изучении влияния пептидсодержащих фракций гемолимфы на рост клеток гепатомы Нер G-2: фракции 18–21 подавляли рост клеток. Этот эффект был выявлен как при использовании МТТ-теста, так и окраске кристаллвиолетом (рис. 2). После ингибирующего действия фракций 18–22 наступает в той или иной степени выраженности активирующее действие компонентов последующих фракций зоны пептидов гемолимфы. Таким образом, в присутствии фракций гемолимфы, содержащих пептиды, обнаружены активирующее и ингибирующее влияния на рост трансформированных клеток. Следует отметить, что подобного эффекта не было обнаружено при анализе роста нормальных фибробластов кожи человека.

Для исследования природы выявленных эффектов компонентов гемолимфы на рост культивируемых клеток проведено исследование особенностей биосинтеза белков и ДНК в них (рис. 3).

Анализ рис. 3 позволяет утверждать, что впервые удалось разделить ингибирующую практически до 0 и активирующую на 285% активности во фракциях 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 [9]. По всей видимости, при разведении первой исчезает ингибирующая активность, в результате чего проявляется активирующая. Полученные фундаментальные данные объясняют механизм жизненного цикла насекомого на стадии куколки с последовательностью процессов гистолиза и гистогенеза. 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 [10].

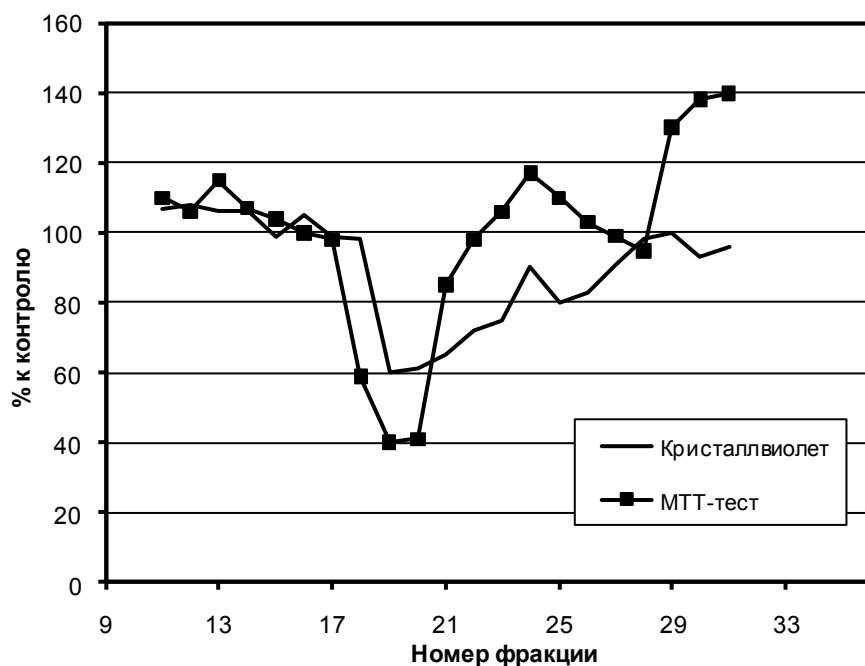


Рис. 2. Рост клеток Нер G2 через 48 ч после инкубации с пептид-содержащими фракциями гемолимфы.

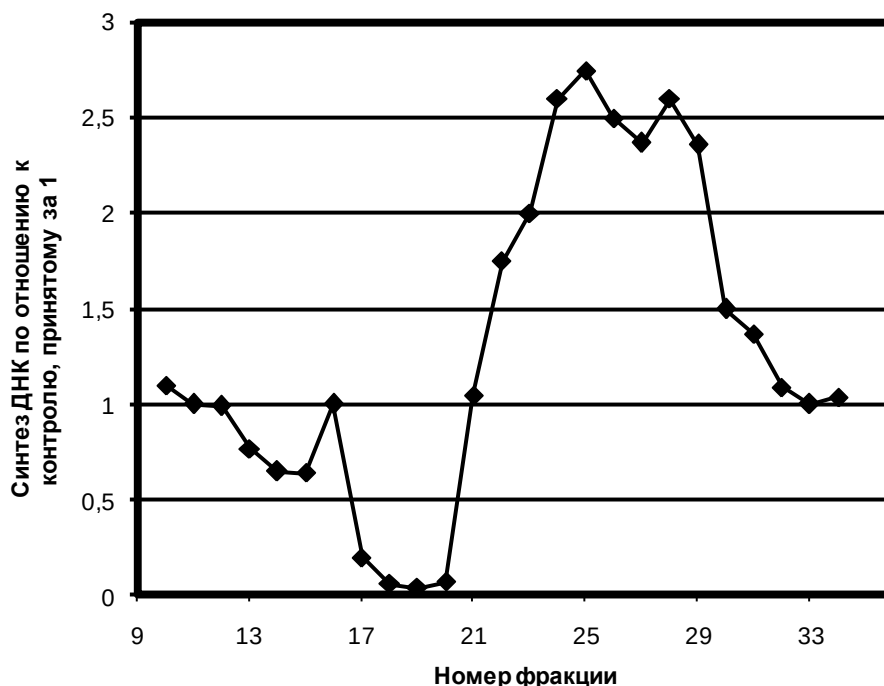


Рис. 3. Синтез ДНК в трансформированных клетках Нер G2 через 48 ч после инкубации с фракциями гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащими пептиды.

Получение гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда. Известен способ получения лечебного экстракта [11], который включает измельчение куколок шелкопряда; экстракцию дистиллированной водой в три последовательных приема путем нагрева до температуры кипения, предусматривающую первое экстрагирование в соотношении с водой 1:5 и слив полученного экстракта, долив к биомассе воды в соотношении 1:3 и слив второй фракции экстракта, долив воды в соотношении 1:2 и смешивание третьей фракции экстракта с предыдущими экстрактами; фильтрацию смеси экстрактов; выдерживание в течение 18–20 часов при 2–5°C; повторную фильтрацию; доведение объема фильтрата водой до 1 литра; введение в экстракт хлорида натрия для получения изотонического раствора; разлив по флаконам и стерилизацию готового экстракта. Данный способ характеризуется сравнительной простотой осуществления, эффективностью получения экстрагируемых веществ из биомассы и предназначен для изготовления препаратов ветеринарного назначения, обладающих удовлетворительной антитоксической активностью. Существенным недостатком этого способа является то, что он, в силу присущих ему приемов осуществления, например применения дистилли-

рованной воды, наличия отдельной операции введения хлорида натрия и отсутствия нормирования, имеет узкую область применения, т.к. изначально предназначен для получения ветеринарных препаратов с антитоксической активностью [12].

Способ получения гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда был оптимизирован путем 1) использования вместо воды 0,85%-го водного раствора хлорида натрия и 2) нормированием полученного экстракта путем разбавления его до объема, содержащего 70–110 мг/л альфа-аминоазота, или 550–850 мг/л суммы свободных аминокислот либо 150–250 мг/л треонина или 120–180 мг/л глутаминовой кислоты. В данном варианте применение 0,85%-го раствора хлорида натрия позволяет устранить почернение экстракта и совместить с процессом экстракции операцию получения изотонического раствора, что исключает применение хлорида натрия как отдельного реагента, приводящего к снижению стоимости и упрощению процесса в целом. При этом увеличение выдержки смеси экстрактов до 24–48 часов при 3–5°C и нормирование экстракта по концентрации в нем основной фармакологически активной субстанции позволяют расширить область применения способа и спектр профилак-

тического и лечебного действия препаратов на его основе, т.к. повышается эффективность получения экстрагируемых веществ и обеспечивается возможность их нормирования в заданных величинах [13].

Заключение. В результате проведенных многолетних исследований показано, что содержание общего белка в гемолимфе куколок составляет $55 \pm 4,0$ г/л, а содержание свободных аминокислот – 14,6 г/л. В гемолимфе обнаружен полный набор протеиногенных аминокислот, включая все незаменимые аминокислоты. Общее содержание растворимых белков в теле куколок и жировом теле было наибольшим при питании гусениц листьями ивы. В гемолимфе куколок дубового шелкопряда содержание аскорбиновой кислоты больше в десять раз по сравнению с гемолимфой виноградных улиток. На протяжении диапаузы в гемолимфе увеличивается количество калия и мочевой кислоты. В первой четверти диапаузы гистоллиз происходит с помощью механизмов апоптоза. В этот период гемолимфа способна вызывать апоптоз в стволовых клетках жировой ткани крыс. Доказано наличие ингибирующих и активирующих субстанций в составе гемолимфы. Высказано предположение об их ключевой роли в чередовании процессов гистолиза и гистогенеза в фазе диапаузы. Разработан способ получения препарата из куколок дубового шелкопряда для профилактики инсулинорезистентности.

ЛІТЕРАТУРА

1. Теоретические основы разведения китайского дубового шелкопряда в Беларуси / С.И. Денисова. – Минск: УП «Технопринт», 2002. – 234 с.
2. Экология листогрызущих насекомых / В.А. Радкевич. – Минск: Наука и техника, 1980. – 239 с.
3. Словарь-справочник энтомолога / С.П. Белошапкин [и др.]; сост. Ю.А. Захваткин, В.В. Исаичев. – М.: Нива России, 1992. – 334 с.
4. Биология развития: пер. с англ.: в 3 т. / С. Гилберт. – М.: Мир, 1995. – Т. 3. – 352 с.
5. Основы физиологии насекомых / В.П. Тыщенко. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1976. – Ч. 1: Физиология метаболических систем. – С. 30, 219–256.
6. Чиркин, А.А. Содержание свободных аминокислот в безбелковых фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2011. – № 6(66). – С. 46–53.
7. Подолинская, А.А. Количественное определение витаминов в биологических объектах и поливитаминные препараты // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / А.А. Подолинская [и др.]. – Минск: БелСАинформ «Сизлтон», 2009. – Вып. 11. – С. 172–177.
8. Чиркин, А.А. Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, М.М. Зафранская, Т.А. Толкачева // Весн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2011. – № 1(61). – С. 30–36.
9. Чиркин, А.А. Антиоксидантные и ростостимулирующие эффекты гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология: матер. 3-й Междунар. науч. конф. – Минск, 2009. – С. 124–127.
10. Чиркин, А.А. Разделение ингибирующей и активирующей синтез ДНК активностей в гемолимфе куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, О.Ю. Абакумова, Т.А. Толкачева // Фундаментальные и прикладные проблемы стресса: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. – Витебск, 2011. – С. 37–39.
11. Способ получения лечебного экстракта / В.А. Трокоз [и др.] // Авторское свидетельство СССР, № 178439 А1; патент Украины 16965 (1997 год).
12. Трокоз, В.А. Биологически активные продукты из дубового шелкопряда: аспекты использования с лечебно-профилактической целью / В.А. Трокоз [и др.] // Сборник тезисов 2-й Всероссийской конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных. – М., 2006. – С. 21–28.
13. Способ получения средства для профилактики инсулинорезистентности / А.А. Чиркин [и др.] // Патент Республики Беларусь № 15645. Зарегистрировано 26.12.2011.

Поступила в редакцию 09.07.2012. Принята в печать 24.08.2012

Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.