

УДК 576.343

А.А.ЧИРКИН¹, О.Ю.АБАКУМОВА², Т.А.ТОЛКАЧЕВА¹

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА И ВЛИЯНИЯ НА КЛЕТКИ И ТКАНИ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ ГЕМОЛИМФЫ КУКОЛОК ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

¹ - Витебский государственный университет им. П.М. Машерова, Витебск, Беларусь;² - Институт биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

Методом колоночной хроматографии на сефадексе G25 fine были выделены три группы веществ из гемолимфы куколок дубового шелкопряда. Определен аминокислотный состав фракций гемолимфы. Установлено, что фракции, содержащие высокие концентрации аргинина и лизина подавляют рост и включение меченого тимидина в ДНК клеток гепатомы Нер G2, но усиливают рост фибробластов кожи человека.

Ключевые слова: аминокислоты, дубовый шелкопряд, культивирование клеток, цитотоксичность, трансформированные клетки, фибробласты

На протяжении последних 100 лет для целей тканевой терапии используют лизаты органов, в процессе получения которых применяют гидролитические ферменты (протеиназы, амилазы, липазы, нуклеазы). Известны два метода приготовления лизатов ферментативным путем: аутолиз – гидролиз собственными тканевыми ферментами, и гетеролиз – расщепление, экзогенными ферментами. Наряду с ферментативным расщеплением применяют кислотный гидролиз и автоклавирование – действием повышенного давления при высоких температурах. При автоклавировании происходит глубокое расщепление белков с возможным образованием продуктов, не характерных для внутренней среды организма [3]. В Европе широкое распространение получили уникальные органопрепараты, изготовленные по стандартам клеточной технологии Theurer К.Е. [10]. Наибольшие успехи были достигнуты в научном обосновании пептидотерапии [2]. В разработке пептидотерапии можно условно выделить два направления. Первое – это химический синтез аминокислот и пептидов и применение их в виде монопрепаратов (твердофазный пептидный синтез по Р. Меррифилду). Это позволило начать производство синтетических пептидов для клинической практики. Благодаря методам молекулярной биотехнологии появились рекомбинантные фармакологические препараты инсулина, глюкагона, нейрпептидов и др. В рамках доказательной медицины эффективность таких препаратов, особенности их фармакокинетики и фармакодинамики изучаются без особых погрешностей и допущений, поскольку известно химическое строение фармакологически активной субстанции. Однако, синтез биологически совместимых и активных пептидов методом подбора входящих в них аминокислот является весьма трудной задачей, связанной с большим количеством экспериментов *in vivo* и *in vitro*. Второе направление – это выделение из органов и тканей биологически активных смесей аминокислот и пептидов, определение их состава с последующим синтезом их компонентов химическим путем и использование таких композиций для лечения патологических процессов. Начиная с 70-х годов прошлого века в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН используется такой подход к поиску физиологически активных пептидов. Создан класс препаратов, получивших общее название «Цитогены» [4]. Было высказано и подтверждено предположение, что действие этих препаратов может быть связано с регулирующей экспрессии генов, в частности, на уровне транскрипции [5].

Все вышесказанное показывает, что для оптимизации пептидотерапии необходимо решение двух задач: во-первых, необходимо достижение строго определенной глубины гидролиза макромолекул биологического материала и, во-вторых, следует иметь точное представление о составе гидролизата с выделением основной действующей субстанции. Для решения этих задач был осуществлен поиск биологического объекта, в котором в естественных условиях происходит гидролиз с последующим использованием продуктов гидролитического распада макромолекул для

создания новых тканей. Таким объектом оказался дубовый шелкопряд (*Antheraea pernyi* G.-M.), включающий в жизненный цикл фазу куколки между личинкой (гусеница) и имаго (бабочка). Куколка этого насекомого находится в состоянии диапаузы 7-8 месяцев. В этом периоде жидкое содержимое куколок, образованное в результате гистолитиза тканей гусеницы V возраста, устойчиво к окислительному стрессу и бактериальной контаминации. Следовательно, в биотехнологии можно использовать жидкое содержимое куколок как сырье для получения антиоксидантных, бактериостатических и иммуномодулирующих препаратов. Это выгодно отличает жидкое содержимое куколок («гемолимфа») от продуктов, обогащенных пептидами и свободными аминокислотами, полученными путем гидролиза других живых объектов, чаще гидробионтов. Всего в гемолимфе куколок содержится 130-150 ммоль/л свободных аминокислот, из них на долю незаменимых приходится до 30% [1]. Свободные аминокислоты являются результатом гистолитиза тканей гусеницы V возраста за счет стимуляции апоптоза в клетках [6]. В конце диапаузы должны происходить биосинтетические процессы, направленные на органогенез бабочки. Поэтому в процессе диапаузы в гемолимфе куколок следует ожидать смены ингибирующего биосинтезы действия на активирующие их. Следует предположить, что за ингибирующие и активирующие активности отвечают разные компоненты гемолимфы, поэтому целесообразен их поиск в ее различных фракциях.

Целью данной статьи явилось изучение аминокислотного состава жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда и исследование его влияния на клетки и ткани живых организмов. Выбор этой цели обоснован тем, что основной проблемой при конструировании аминокислотных смесей для профилактических и лечебных целей является подбор соотношения и концентраций аминокислот.

Материал и методы. Для разделения гемолимфы куколок дубового шелкопряда использовали колонку диаметром 2,5 см и объемом 130 мл, заполненную сефадексом G25 fine, уравновешенную 0,01 M NH_4HCO_3 . Собирали фракции объемом 3 мл со скоростью 3 мин/фракция. Анализ элюатов проводили путем спектрофотометрии при 210, 260 и 280 нм, что позволяет ориентировочно оценить наличие пептидов, нуклеиновых кислот (нуклеотидов) и белков. Качественную и количественную 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 M Na-боратном буфере, pH 9,4 (дериватизирующий раствор смешивали с пробой с соотношением 6:1); 2) последующая дериватизация аминокислот с вторичным атомом азота (пролина и оксипролина) 9-флуоренилметилкарбонилхлоридом (FMOC), раствор которого в ацетонитриле 7 мг/мл добавляли в объеме 1,5 исходного объема хлорнокислого экстракта; 3) нейтрализация пробы добавлением 0,2 M раствора хлорной кислоты до нейтрального или слабокислого значения pH, после чего ее немедленно вводили в хроматограф. Вся процедура дериватизации осуществлялась автоматически с помощью автоанализатора Agilent 1200, который термостатировали при 5°C. Идентификация и количественная оценка полученных значений производилась программой Agilent ChemStation B.04.02 путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой искусственной смеси аминокислот. Последняя содержала равные количества определяемых соединений по 500 ммоль/мл каждого и обрабатывалась так же, как соответствующие пробы. Использовали концентрат стандартной смеси аминокислот (кислых, нейтральных и основных) фирмы «Aldrich» (США). В работе применяли колонку Zorbax XDB C₈, 3,5 мкм, 3x150 мм; скорость потока была 0,2 мл/мин, температура колонки - 37°C. Подвижная фаза А: 0,1 M 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. В описанной системе последовательно элюировались и определены следующие соединения: аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn), серин (Ser), глутамин (Gln), гистидин (His), глицин (Gly), фосфотаноламин (PEA), треонин (Thr), цитруллин (Citr), аргинин (Arg), β-аланин (β-Ala), аланин (Ala), таурин (Tau), тирозин (Tyr), валин (Val), метионин (Met), цистатионин (Ctn), цистин (Cys), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), орнитин (Orn), лизин (Lys), пролин (Pro) [8].

Материал фракций использовали для определения цитотоксической активности в опытах *in vitro* в культуре клеток [7]. Линии клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), Нер G2

(гепатокарцинома) были получены из American Type Culture Collection (США). Фибробласты кожи здоровых людей (ФБЧ), которые использовали в эксперименте только на 2-8 пассажах, были получены из лаборатории биотехнологии ММУ им. Н.М.Сеченова. Культивирование клеток производили во влажной атмосфере (5% CO_2 , 37°C). Использовали среды DMEM, RPMI 1640, а также термостабилизированные эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и лошадиную сыворотку (ЛС) фирмы «Gibco» США. Среда инкубации содержали 10% ЭТС, а при культивировании ФБЧ в среду дополнительно добавляли 5% ЛС. Среда содержали 2 мМ глутамина, 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-ти луночные планшеты с плотностью $2,5 \times 10^3$ клеток/лунку. Клетки преинкубировали в планшетах (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. В конце инкубации оценивали цитотоксичность с помощью МТТ-теста. Реактив МТТ (ДиаЭм, Германия) представляет собой тиазольный 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%-ного раствора МТТ. Затем клетки культивировали еще 3 часа при 37°C. После удаления культуральной среды кристаллы формазана растворяли в 0,1 мл DMSO при встряхивании на Titramax 101 в течение 10 мин. Суспензию клеток переносили в 96-ти 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 те 96-ти луночные планшеты с плоским дном, в которых проводили реакцию МТТ-теста. После их встряхивания в течение 10 мин измеряли оптическую плотность растворов на мультиканале EX (Lab. System, Финляндия) при длине волны 540 нм. Количество выживших клеток рассчитывали в процентах от контроля, которым являлись клетки, культивированные без добавления фракций гемолимфы.

Для анализа интенсивности синтеза ДНК в клетках каждую исследуемую клеточную линию культивировали в двух 96-ти 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 μCi /лунку [^3H]-тимидина (Чехия, препараты с активностью 56 мCi/mmol). 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 и 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 сцинтилляционным счетчике TriCarb 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. Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью компьютерной программы Excel.

Результаты и обсуждение. В результате хроматографии на колонке с сефадексом G25 fine получены более 50 фракций, в которых, судя по величинам поглощения при 210, 260 и 280 нм, содержатся три группы веществ: полимеры (возможно, белки и нуклеопротеины), пептиды и низкомолекулярные биорегуляторы. Пептиды находятся во фракциях 10-32. При анализе распределения, концентрации белков, мочевой кислоты, сульфгидрильных групп и восстановленного глутатиона оказалось, что они распределяются в области первого и второго пиков. Поскольку глутатион - трипептид, можно предположить, что такие короткие пептиды локализованы во фракциях 17-24, выходящих с элюционным объемом 64-91 мл (рис. 1, 2).

В этих фракциях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии было исследовано содержание свободных аминокислот (табл. 1).

На первом этапе исследования 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 G2: фракции 18-19 подавляли рост клеток. Этот эффект был выявлен как при использовании МТТ-теста, так и окраски кристаллвиолетом (рис. 3).

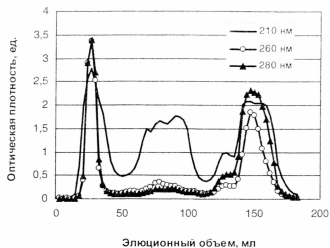


Рис. 1. Распределение оптических плотностей во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда.

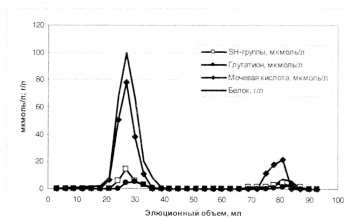


Рис. 2. Содержание белков, SH-групп, мочевой кислоты и глутатиона во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда

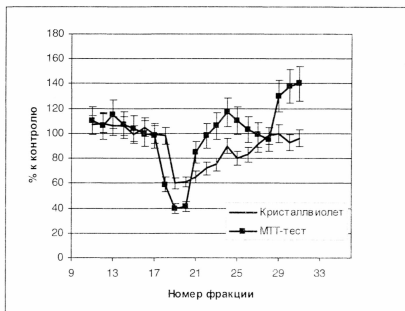


Рис. 3. Рост клеток Нер G2 через 48 ч после инкубации с пептид-содержащими фракциями гемолимфы

Табл. 1. Содержание свободных аминокислот во фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда (мкмоль/л)

Номер фракции	17	18	19	20	21	22	23	24
Элюционный объем, мл	64,6	68,4	72,2	76	79,8	83,6	87,4	91,2
Аспарагиновая кислота	3,23	11,6	5,76	10,6	8,09	3,27	7,37	1,97
Глутаминовая кислота	38,3	26,4	54,7	331	116	6,10	14,9	2,35
Аспарагин	3,23	1,87	29,4	35,4	28,5	3,34	1,98	0,59
Серин	45,9	9,51	570	1505	1171	260	35,2	7,28
Глутамин	0,30	1,61	0,96	91,9	362	0,59	12,9	2,23
Гистидин	3,21	1,59	6,59	155	1011	2294	931	253
Глицин	30,1	9,78	349	1222	1101	305	53,5	11,7
Фосфотаноламин	148	17,7	114	28,2	8,11	1,30	4,50	0,90
Треонин	106	12,1	598	853	416	69,5	9,35	2,49
Цитруллин	3,04	1,18	5,00	143	12,7	13,0	0,72	0,16
Аргинин	1103	457	331	209	373	95,0	15,9	2,86
β -аланин	23,0	8,96	123	148	55,2	12,7	1,13	0,43
Аланин	58,2	6,48	762	907	321	16,4	11,3	3,13
Таурин	2,20	7,99	5,88	8,16	5,39	2,60	8,28	2,13
Тирозин	0,05	0,49	0,41	0,61	10,5	24,8	9,92	7,67
Валин	153	6,08	621	508	162	11,5	5,15	2,56
Метионин	7,71	1,06	3,56	44,8	66,3	23,6	2,48	0,14
Цистатионин	139	22,9	505	1302	207	36,5	18,6	9,48
Триптофан	0,04	0,14	0,19	0,06	0,15	0,66	1,42	0,68
Изолейцин	0,11	0,35	307	368	142	2,99	1,26	0,49
Фенилаланин	42,3	1,22	1,35	1,57	0,99	23,7	93,8	134
Лейцин	21,1	1,52	238	343	243	1,78	1,22	0,50
HPro	4,23	0,87	6,59	11,0	4,08	1,41	1,46	2,05
Орнитин	58,0	25,1	143	86,0	22,3	20,5	25,3	25,7
Лизин	1859	368	1071	219	41,9	8,78	7,38	8,25
Пролин	125	21,0	689	520	142	23,3	20,0	27,4

В этой же области пептидсодержащих фракций гемолимфы найдено их аналогичное влияние на рост клеток 29 3Т - иммортализованные аденовирусом 5 типа эмбриональные клетки почек человека. Ингибирующее действие на рост этих клеток по результатам МТТ-теста оказали также фракции 18-20. При окраске кристаллином зона ингибирования была более широкой, а именно такой эффект демонстрировали фракции 15-22. Сравнительный анализ влияния фракций гемолимфы на рост клеток Нер G2 и 29 3Т показал, что после ингибирующего действия фракций 18-19 наступает в той или иной степени выраженности активирующее действие компонентов последующих фракций зоны пептидов гемолимфы. Аналогичная активность фракций гемолимфы была получена также при исследовании роста клеток карциномы молочной железы. В этом эксперименте удалось показать, что выявленные эффекты ингибирования и активации роста клеток, вызываемые рядом расположенными фракциями гемолимфы, прослеживается через 48 и 72 часа культивирования клеток [8].

Таким образом, в присутствии фракций гемолимфы, содержащих свободные 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 (рис. 4). 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 исследования природы выявленных эффектов компонентов гемолимфы на рост культивируемых клеток проведено исследование особенностей биосинтеза белков и ДНК в них (рис. 5).



Рис. 4. Рост клеток нормальных фибробластов человека через 72 ч после инкубации с фракциями гемолимфы куколок дубового шелкопряда, содержащими свободные аминокислоты и пептиды.

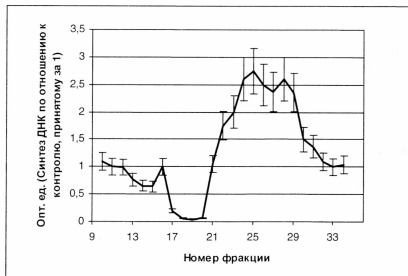


Рис. 5. Включение ¹⁴C-тимидина в ДНК клеток гепатомы Нер G2

При изучении влияния пептидсодержащих фракций гемолимфы куколок дубового шелкопряда установлено, что фракции 17-19 подавляли включение метки в ДНК клеток гепатомы Нер G2. Последующие фракции 21-30 стимулировали включение меченого тимидина в ДНК клеток гепатомы Нер G2. Анализ этих данных позволил утверждать, что впервые удалось разделить ингибирующую практически до 0 и активирующую на 285% активности, связанные с биосинтезом ДНК. 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. По всей видимости, при разведении первой исчезает ингибирующая активность, в результате чего проявляется активирующая. Поэтому малая доза более эффективна. Этот эффект не противоречит принципам гомеопатической медицины и лежит в основе предлагаемого средства для профилактики инсулинорезистентности [9].

В табл. 2 приведены данные о влиянии аминокислотных смесей в составе определенных фракций гемолимфы и искусственно созданных смесей по соотношению и количеству

аминокислот (см. табл. 1), характерных для этих фракций, на длину корней обработанных фракциями или искусственными смесями семян ячменя, выращенных роллерным способом.

Табл. 2. Влияние природных и искусственных смесей аминокислот на длину корней обработанных семян ячменя.

Номер фракции	Жидкость для обработки семян	Длина корней, мм
Контроль	Дистиллированная вода	119±2,76
15	Фракция	139±2,82 ¹
15	Раствор аргинина+лизина	129±2,03 ^{1,2}
15	Искусственная смесь	132±1,92 ¹
16	Фракция	147±3,44 ¹
16	Искусственная смесь	134±1,62 ^{1,2}
17	Фракция	150±2,74 ¹
17	Искусственная смесь	138±1,34 ^{1,2}
18	Фракция	132±2,66 ¹
18	Искусственная смесь	135±1,94 ¹
19	Фракция	133±2,01 ¹
19	Искусственная смесь	132±1,76 ¹
20	Фракция	135±1,52 ¹
20	Искусственная смесь	129±1,41 ^{1,2}

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ² – $p < 0,05$ по сравнению с данными каждой строки «Фракция».

Установлено, что эффект действия искусственных смесей аналогичен действию фракций гемолимфы. Для 16 и 17 фракций эффект смесей ниже, что может быть связано с минорными и пептидными компонентами этих фракций.

Заключение. Итак, концентрации и соотношения свободных аминокислот имеют важное значение для получения определенного биологического эффекта. Поэтому гемолимфа куколок дубового шелкопряда может использоваться в процессе создания оптимизированных по содержанию и соотношению смесей аминокислот для медико-биологических целей. Например, спектры аминокислот фракций гемолимфы, отвечающие за ингибирующую и активирующую активности, связанные с биосинтезом ДНК, могут послужить основой для создания противоопухолевых и биостимулирующих препаратов.

В данной биологической системе достигается оптимальная глубина гидролиза макромолекул до свободных аминокислот, нуклеотидов и моносахаридов, необходимая для точного воспроизведения макромолекул в процессе гистогенеза. Это выгодно отличает рассматриваемый биологический способ гистолиза тканей от химического, термического и других физико-химических способов получения биологически активных субстанций. Анализ биологической активности фракций гемолимфы показывает, что ингибирующее рост и биосинтез ДНК действие на трансформированные клетки связано с высокой концентрацией аргинина и лизина, а биостимулирующие эффекты требуют полного набора протеиногенных аминокислот, включая гистидин и фенилаланин. В то же время аргинин и лизин способны стимулировать рост нетрансформированных клеток (фибробласты).

Химический анализ гемолимфы куколок дубового шелкопряда обосновывает следующие направления применения этого уникального источника продуктов гистолиза для биотехнологических и медико-биологических целей:

- использование как иммуномодулятора на уровне нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов (патент на изобретение № 12504 Республики Беларусь);
- использование как противовоспалительного средства за счет подавления генерации активных метаболитов кислорода;
- использование как средства, для предотвращения негативных реакций на метаболизм гиперпродукции гомоцистеина (патент на изобретение № 12608 Республики Беларусь);
- использование экстракта куколок дубового шелкопряда как источник незаменимых (эссенциальных) субстанций для регуляции метаболизма;
- использование экстракта в гомеопатических дозировках (порядка 7-70 мкг свободных аминокислот на 1 кг массы тела) для профилактики метаболического синдрома (патент на изобретение № 15645 Республики Беларусь);

А. А. Чиркин, О. Ю. Абакумова, Т. А. Толкачева

- коррекция действия урсодезоксихолевой кислоты и использование экстракта куколок дубового шелкопряда в качестве гепатопротектора;
 - использование экстракта куколок дубового шелкопряда как модулятора функции коркового вещества надпочечников и щитовидной железы;
 - разработка йодированных препаратов из гемолимфы куколок дубового шелкопряда для коррекции гипотиреозного состояния и гипоальфахолестеринемии;
 - мониторинг жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда как способ долговременной оценки экологических особенностей региона.
- Работа поддержана грантом БРФФИ (договор № Б11ВТ-007)

Литература:

- [1]. І. Денисова С. П., Шейбак В. М., Абакумова О. Ю. и др. // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта, 2007. № 1 (43). С. 143–149.
- [2]. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). СПб.: Наука, 1996.
- [3]. Ролік І. С. Основы клинической фармакологии органопрепаратов. М.: РегБиоМед, 2004.
- [4]. Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения СПб: Фолиант, 2001.
- [5]. Хавинсон В. Х. // Бюл. экп. биол. мед. 2001. Т. 132. С. 228–229.
- [6]. Чиркин А. А., Зафранская М. М., Толкачева Т. А. // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта, 2011. № 1 (61). С. 30–36.
- [7]. Чиркин А. А., Абакумова О. Ю., Толкачева Т. А. и др. // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта, 2011. № 5 (65). С. 43–48.
- [8]. Чиркин А. А., Толкачева Т. А., Чиркина А. А. и др. // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта, 2011. № 6 (66). С. 46–53.
- [9]. Chirkin A. A., Katin A. J., Danchenko E. O. et al. // Homoeopathic Lincs. Internat. Journ. Classical Homoeopathy. 2011. Vol. 24, № 3/11. P. 195–197.
- [10]. Theurer K. E. Innovative Biotherapie: Fortschritte d. Zell-, Molekular u. Immunobiologie. Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1987.

Поступила в редакцию: 23.07.2012 г.

A.A. CHIRKIN¹, O.YU. ABAKUMOVA², T.A. TOLKACHEVA¹

STUDY OF AMINO ACID COMPOSITION AND EFFECTS ON CELLS AND TISSUES OF LIVING ORGANISMS HEMOLYMPH OAK SILKWORM PUPAE

¹ - Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus;

² - Institute of Biomedical Chemistry RAMS named after V.N. Orekhovich, Moscow, Russia

Summary

By column chromatography on Sephadex G25 fine were isolated three groups of substances from the hemolymph of the pupae of silkworm oak. Defined amino acid composition of hemolymph fractions. Found that the fraction containing high concentrations of arginine and lysine inhibit the growth and incorporation of labeled thymidine into DNA of hepatoma cell Hep G2, but also enhance the growth of human dermal fibroblasts.

Key words: amino acids, oak silkworm, cultivation of cells, cytotoxicity, transformed cells, fibroblasts