

Содержание свободных аминокислот в безбелковых фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда

А.А. Чиркин*, **Т.А. Толкачева***, **А.А. Чиркина***, **Е.М. Дорошенко****, **В.М. Шейбак****
*Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»
**Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Методом колоночной хроматографии на сефадексе G25 fine были выделены 43 фракции гемолимфы. В каждой из этих фракций был определен спектр свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа «Agilent 1200». В гемолимфе, экстракте куколок дубового шелкопряда и фракциях гемолимфы, полученных методом гель-фильтрации, был проведен сравнительный анализ содержания свободных аминокислот. Наиболее оптимальная по количеству, составу и соотношению смесь свободных аминокислот была получена при использовании метода препаративной гель-хроматографии. Протеиногенные аминокислоты в зависимости от содержания вошли в шесть групп низкомолекулярных азотсодержащих веществ: группа 1 – гистидин, лизин, аргинин, серин, глицин; группа 2 – треонин, аланин, валин, изолейцин, пролин; группа 3 – глутаминовая кислота, глутамин, лейцин; 4 – метионин, фенилаланин; группа 5 – аспарагин, гидроксипролин; группа 6 – аспарагиновая кислота, тирозин, триптофан.

Ключевые слова: дубовый шелкопряд, высокоэффективная жидкостная хроматография, гель-хроматография, свободные аминокислоты, незаменимые аминокислоты.

Free amino acids in the protein-free hemolymph fractions of oak silkworm pupae

A.A. Chirkin*, **T.A. Tolkacheva***, **A.A. Chirkina***, **E.M. Doroshenko****, **V.M. Sheybak****
*Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»
**Educational establishment «Grodno State Medical University»

By column chromatography on Sephadex G25 fine 43 fractions of hemolymph were extracted. In each of these fractions spectrum of free amino acids by HPLC using chromatographer «Agilent 1200» was identified. In hemolymph, pupal extract of oak silkworm and hemolymph fractions, which were obtained by the method of gel filtration, a comparative analysis of free amino acids was made. Most optimal in quantity, composition and ratio free amino acid mixture was obtained using the method of preparative gel chromatography. Proteinogenic amino acids, depending on the content, were included into the six groups of low-molecular nitrogen compounds: group 1 – histidine, lysine, arginine, serine, glycine; group 2 – threonine, alanine, valine, isoleucine, proline; group 3 – glutamic acid, glutamine, leucine; group 4 – methionine, phenylalanine; group 5 – asparagine, hydroxyproline; group 6 – aspartic acid, tyrosine, tryptophan.

Key words: oak silkworm, high performance liquid chromatography, gel chromatography, free amino acids, essential amino acids.

Гемолимфа куколок образуется в процессе гистолиза тканей гусеницы. Этот процесс включает запрограммированные механизмы повреждения клеток (апоптоз) и активацию ферментативных систем деградации биополимеров, включая белки [1–3]. В конце диапаузы из компонентов гемолимфы будет формироваться новая стадия эукариотического организма – бабочка. Поэтому в процессе диапаузы в гемолимфе куколок должно содержаться одинаковое количество мономерных единиц биополимеров, в том числе свободных аминокислот и других азотсодержащих веществ. Свободные протеиногенные аминокислоты после активации в форме аминоксил-тРНК будут включаться в белки, обеспечивая формирование белковых структур организма бабочки и ее фенотип.

Целью работы было исследование содержания свободных аминокислот в гемолимфе,

в безбелковом экстракте куколок, полученном путем трехкратного кипячения, и во фракциях гемолимфы, полученных путем отделения белков на молекулярных ситах.

Материал и методы. Для разделения гемолимфы куколок дубового шелкопряда использовали колонку диаметром 2,5 см и объемом 130 мл, заполненную сефадексом G25 fine, уравновешенную 0,01М NH₄HCO₃. Предварительно сефадекс с достаточным количеством воды кипятили в течение 30 мин, затем отмучивали для удаления мелких частиц. Для фракционирования на колонке с сефадексом G25 fine содержимое куколок шелкопряда (в среднем 2 мл) 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 цен-

трифужных 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 Sephadex G25 fine. Использовали для элюции 0,01М NH_4HCO_3 . Собирали фракции объемом 3 мл со скоростью 3 мин/фракция. Анализ элюатов (пробирки 1–43) проводили путем спектрофотометрии при 210, 260 и 280 нм.

Определение уровней аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в хлорнокислых экстрактах гемолимфы и ее фракциях. Пробы депротеинизировали добавлением равных объемов 1М раствора хлорной кислоты, содержащей внутренний стандарт (0,2 мМ δ -аминовалериановой кислоты (dAVA), а также 50 мг/л ЭДТА и 50 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в качестве антиоксиданта), после чего центрифугировали на холоду при 16000 g в течение 15 мин. Супернатант немедленно отделяли от осадка. Пробы хранили при -18°C до анализа не более 14 суток, после размораживания повторно центрифугировали. Растворы стандартов, используемые для отработки разделения и калибровки хроматографической системы, обрабатывали аналогичным способом.

Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводилась обращенно-фазной хроматографией 1) с предколоночной дериватизацией аминокислот, содержащих первичную аминогруппу, 0,4% о-фталевым альдегидом и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислотой в 0,4М Натриумном буфере, pH 9,4 (дериватирующий раствор смешивали с пробой в соотношении 6:1); 2) последующей дериватизацией аминокислот со 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) затем пробу нейтрализовали добавлением 0,2М раствора хлорной кислоты до нейтрального или слабнокислого pH, после чего немедленно вводили в хроматограф. Вся процедура дериватизации осуществлялась автоматически с помощью автосамплера Agilent 1200, который термостатировали при 5°C [4–5].

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 нмоль/мл каждого и обрабатывалась так же, как соответствующие пробы. Использовался 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 (CA), L-глутамин, L-аспарагин, O-фосфоэтанолламин, в тех же концентрациях.

В качестве метода-прототипа использовался метод анализа свободных аминокислот, в котором применялась колонка Zorbax XDB C₈, 3,5 мкм, 3×150 мм, скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 37°C . Подвижная фаза А: 0,1М 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; температура колонки 37°C [6]. В работе использован следующий профиль градиентного элюирования.

Таблица 1

Профиль градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза В, %
0,00	4,3
36,00	14,6
64,00	28,8
75,00	39,0
79,00	100,0
91,00	100,0
93,00	4,3

В описанной системе последовательно элюировались и определены следующие соединения: цистеиновая кислота (CA), аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn), серин (Ser), α -аминоадипиновая кислота (α -AAA), глутамин (Gln), гистидин (His), глицин (Gly), 3-метилгистидин (3MHis), фосфоэтанолламин (PEA), треонин (Thr), 1-метилгистидин (1MHis), цитруллин (Citr), аргинин (Arg), β -аланин (β -Ala), аланин (Ala), таурин (Tau), β -аминоизомасляная кислота (β -ABA), γ -аминомасляная кислота (GABA), тирозин (Tyr), α -аминомасляная кислота (α -ABA), этаноламин (EA), δ -аминовалериановая кислота (δ -AVA), валин (Val), метионин (Met), цистатионин (Ctn), цистин (Cys), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile),

лейцин (Leu), OH-пролин (H-Pro), орнитин (Orn), лизин (Lys), пролин (Pro).

В данной работе разделение проводили при скорости потока подвижной фазы 0,3 мл/мин, при этом профиль градиентного элюирования был пересчитан для этой скорости.

Детектирование осуществляли по флуоресценции (231/445 нм для первичных аминокислот и 265/313 нм для пролина и оксипролина).

Результаты и их обсуждение. В табл. 2 представлены усредненные значения концентрации свободных аминокислот в зависимости от способа их извлечения из куколок дубового шелкопряда: из гемолимфы, из фракций гемолимфы после гель-фильтрации на сефадексе G25 fine и из экстракта, полученного трехкратным кипячением измельченных куколок в 0,9% растворе хлорида натрия.

Таблица 2

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

Азотсодержащее соединение	Гемолимфа	Фракции гемолимфы	Экстракт куколок
Аспарагиновая кислота	4,70	0,82	4,97
Глутаминовая кислота	0,89	16,5	30,8
Серин	13,1	75	16,6
Аминоадипиновая кислота	–	1,64	0,23
Глутамин	19,1	18,1	0,51
Гистидин	10,3	114	11,4
Глицин	17,2	61	10,8
Фосфоэтанолламин	–	7,4	1,92
Треонин	10,3	42,6	5,48
1-метилгистидин	–	–	0,65
Цитруллин	2,15	7,2	0,68
Аргинин	–	55	6,03
β -аланин	–	7,4	1,05
Аланин	18,3	45,4	19,6
Таурин	1,00	1,56	0,65
β -аминомасляная кислота	0,51	1,23	0,09
ГАМК	–	0,69	0,38
Тирозин	2,53	1,60	6,63
α -аминомасляная кислота	–	0,06	2,17
Этаноламин	0,22	0,61	0,98
Валин	8,16	31,0	4,59
Метионин	0,67	3,31	0,23
Цистатионин	–	65	4,39
Цистин	–	–	0,35
Триптофан	–	0,82	0,84
Изолейцин	4,33	18,4	2,46
Фенилаланин	1,04	6,70	2,59
Лейцин	4,76	17,2	3,78
Гидроксипролин	0,04	0,55	4,44
Орнитин	–	7,2	12,9
Лизин	8,66	93	16,8
Пролин	5,58	34,5	28,0
Итого:	133,5	736	203

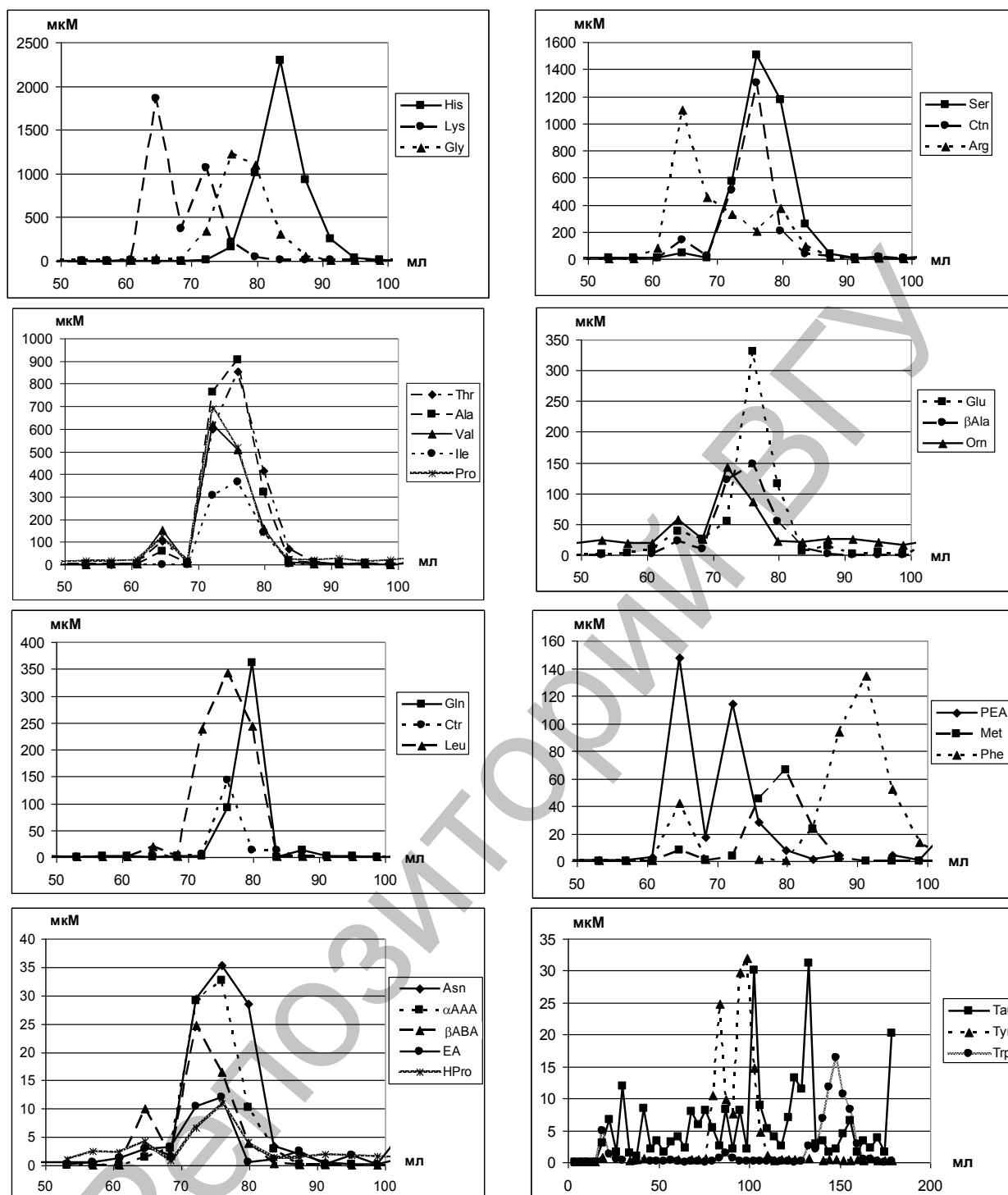


Рис. Профиль элюции аминокислот, содержащихся во фракциях гемолимфы, в зависимости от их концентрации.

Установлено, что по содержанию свободных аминокислот в зависимости от способа их получения анализируемые образцы распределились в следующей последовательности: гель-фильтрация гемолимфы дала в сумме 736 ммоль/л, или 81 г/л свободных аминокислот; в экстракте куколок оказалось 203 ммоль/л,

или 22,3 г свободных аминокислот; в исходной гемолимфе было обнаружено 133,5 ммоль/л, или 14,7 г свободных аминокислот.

По наибольшей концентрации свободные аминокислоты в зависимости от способа их получения распределились в следующей последовательности: в результате гель-фильтрации ге-

молимфы – гистидин, лизин, серин, метионин, глицин, аргинин, треонин, аланин, пролин, метионин, валин, изолейцин, лейцин, глутаминовая кислота и др.; в экстракте куколок – глутаминовая кислота, пролин, аланин, лизин, серин, орнитин, гистидин, глицин, тирозин, аргинин, треонин, аспарагиновая кислота, гидроксипролин, цистатионин, лейцин и др.; в исходной гемолимфе – глутаминовая кислота, аланин, глицин, серин, треонин, лизин, валин, пролин, лейцин, аспарагиновая кислота, изолейцин, тирозин, цитрулин, фенилаланин, таурин и др.

Наибольшее количество незаменимых аминокислот получено при выделении свободных аминокислот методом гель-фильтрации – 38,9%, меньшее количество незаменимых аминокислот было получено из исходной гемолимфы – 36,1% и в экстракте из куколок дубового шелкопряда оказалось 22,4% незаменимых аминокислот от всех выделенных свободных аминокислот.

Все свободные аминокислоты, выделенные методом гель-фильтрации, по концентрации были разделены на 6 групп (рис.).

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 достигнуто хорошее разделение глицина и гистидина. Среди выделенных аминокислот лизин – абсолютно незаменимая аминокислота, а гистидин и аргинин являются незаменимыми в периоде роста и развития организма млекопитающих.

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 выделилось с элюционным объемом 70–85 мл. В наибольшем количестве выделились треонин и аланин, а в наименьшем – изолейцин. Во второй группе оказались три незаменимые аминокислоты – треонин, валин и изолейцин.

В третью группу были выделены 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 и среди них нет незаменимых аминокислот.

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

Полученные результаты показывают, что из куколок дубового шелкопряда возможно 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 (табл. 3).

Безбелковые гидрофильные препараты из куколок содержат природные композиции аминокислот в высокой концентрации и они лишены факторов, влияющих на реактивность систем иммунитета и гуморальную регуляцию функций млекопитающих (отсутствие специфичных для насекомых белков и стероидов и других липофильных биорегуляторов).

Биологическая роль протеиногенных аминокислот

Аминокислота	Продукт	Основные функции
Сумма аминокислот	Протеины	Ферменты, гуморальный и клеточный иммунный ответ
Аланин	Непосредственно	Торможение апоптоза, стимуляция пролиферации лимфоцитов, повышение продукции антител (возможно путем воздействия на клеточные сигнальные механизмы)
Аргинин	NO	Сигнальная молекула, киллинг патогенов, регуляция продукции цитокинов, медиатор иммунопатологических процессов
Лейцин, изолейцин, валин	Непосредственно	Регуляция синтеза белка, активация продукции цитокинов и антител путем воздействия на сигнальные механизмы
Лейцин, изолейцин, валин	Глутамин	Основной энергетический субстрат для клеток иммунной системы, регуляция пролиферации Т-лимфоцитов, синтез белка, а также продукция цитокинов и антител, активация функции макрофагов, торможение апоптоза
Цистеин	Таурин	Антиоксидант, регуляция редокс-потенциала клеток
Глутаминовая кислота	ГАМК, γ -аминомасляная кислота	Нейротрансмиттер, торможение Т-клеточного ответа и воспаления
Глутамин	Глутаминовая и аспарагиновые кислоты	Нейротрансмиттеры, компоненты малатного шунта, регуляторы клеточного метаболизма
Глицин	Непосредственно	Приток кальция через глициновые каналы в клеточной мембране
Глицин	Серин	Метаболизм одноуглеродных радикалов, образование церамидов и фосфатидилсерина
Глицин	Гем	Гемопропротеины (гемоглобин, миоглобин, каталаза, цитохром с), продукция окиси углерода (сигнальная молекула)
Гистидин	Гистамин	Аллергические реакции, вазодиллятор, центральная секреция ацетилхолина
Гистидин	Уроканиновая кислота	Модуляция иммунных кожных реакций
Лейцин	Гидроксиметил-масляная кислота	Регуляция иммунных реакций
Лизин	Непосредственно	Регуляция синтеза NO, антивирусная активность
Метионин	Гомоцистеин	Оксидант, ингибитор синтеза NO
Метионин	Бетаин	Метилирование гомоцистеина в метионин, метаболизм одноуглеродных соединений
Метионин	Холин	Синтез бетаина, ацетилхолина, фосфатидилхолина
Метионин	Цистеин	Синтез глутатиона и продукция H_2S (сигнальная молекула)
Метионин	S-аденозилметионин	Метилирование белков и ДНК, синтез полиаминов, экспрессия генов
Фенилаланин	Непосредственно	Регуляция синтеза тетрагидроптерина (кофактора синтеза NO)
Фенилаланин	Тирозин	Синтез нейротрансмиттеров, которые регулируют функцию нейронов и метаболизм клеток
Пролин	H_2O_2	Киллинг патогенов, взаимодействие клеток, сигнальная молекула
Пролин	Пирролин-5-карбоксилат	Клеточный редокс-потенциал, синтез ДНК, пролиферация лимфоцитов, образование орнитина и полиаминов, экспрессия генов

Серин	Глицин	Антиоксидант, метаболизм одноуглеродных соединений
Серин	Непосредственно	Торможение апоптоза, стимуляция пролиферации лимфоцитов, повышение продукции антител (возможно через клеточные сигнальные механизмы)
Таурин	Таурина хлорамин	Противовоспалительное действие. Антиоксидантное действие
Треонин	Непосредственно	Синтез муциновых белков, которые требуются для сохранения целостности кишечника и его иммунной функции, торможение апоптоза, стимуляция клеточной пролиферации, повышение продукции антител
Триптофан	Серотонин	Нейротрансмиттер, торможение продукции воспалительных цитокинов и супероксидного анион-радикала
Триптофан	N-ацетилсеротонин	Ингибитор синтеза тетрагидробиоптерина, антиоксидант, торможение продукции воспалительных цитокинов и супероксидного анион-радикала
Триптофан	Мелатонин	Антиоксидант, торможение продукции воспалительных цитокинов и супероксидного анион-радикала
Триптофан	Анраниловая кислота	Торможение продукции провоспалительных T-хелпер-1 цитокинов, предупреждение аутоиммунного нейровоспаления, повышение иммунитета
Тирозин	Дофамин	Нейротрансмиттер, регуляция иммунных реакций
Тирозин	Адреналин и норадреналин	Нейротрансмиттер, метаболизм клеток
Тирозин	Меланин	Антиоксидант, торможение продукции воспалительных цитокинов и супероксидного анион-радикала
Аргинин, метионин	Полиамины	Экспрессия гена, синтез ДНК и белка, функция ионных каналов, апоптоз, трансдукция сигналов, антиоксиданты, клеточная функция, пролиферация лимфоцитов и дифференциация
Аргинин, метионин, глицин	Креатин	Антиоксидант, антивирусная функция, противоопухолевое действие
Аргинин, пролин, глутамин	Орнитин	Синтез глутамата, глутамина и полиаминов, целостность митохондрий
Цистеин, глутамат, глицин	Глутатион	Связывание свободных радикалов, антиоксидант, клеточный метаболизм (образование лейкотриенов, глутатионилспермидина, аддуктов NO с глутатионом и глутатионилпротеинов, трансдукция сигнала, экспрессия генов, апоптоз, клеточный редокс-потенциал, иммунный ответ)
Глутамин, аспартат, глицин	Нуклеиновые кислоты	Кодирование генетической информации, экспрессия гена, регуляция клеточного цикла. Синтез белков и мочевой кислоты, пролиферация лимфоцитов
Глутамин, аспартат, глицин	Мочевая кислота	Антиоксидант
Глутамат, глутамин, пролин	Цитруллин	Антиоксидант, синтез аргинина
Глутамин, триптофан	НАДФ(Н)	Коферменты оксидоредуктаз, субстраты для поли-(АДФ-рибоза)полимеразы
Лизин, метионин, серин	Карнитин	Транспорт длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, хранение энергии в виде ацилкарнитинов

Заключение. В результате проведенной работы выделены 43 фракции гемолимфы путем колоночной хроматографии на сефадексе G25 fine. В каждой из них определен спектр свободных аминокислот методом ВЭЖХ. Проведен сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в гемолимфе, экстракте куколок дубового шелкопряда и фракциях гемолимфы, полученных методом гель-фильтрации. Наиболее оптимальная по количеству и соотношению аминокислот смесь свободных аминокислот получена методом препаративной гель-хроматографии.

Работа поддержана грантом БРФФИ (договор № Б11ВТ-007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисова, С.И. Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда / С.И. Денисова [и др.] // Вестн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2007. – № 1(43). – С. 143–149.
2. Чиркин, А.А. Жизнеспособность клеток куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Вестн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2011. – № 1(61). – С. 30–36.
3. Чиркин, А.А. Функциональные и биохимические характеристики гемолимфы куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы VIII Междунар. конф., 1–2 апреля 2010 г. – Минск, 2010. – С. 130–132.
4. Дорошенко, Е.М. Содержание свободных аминокислот в тромбоцитах: взаимоотношения с аминокислотным пулом плазмы крови / Е.М. Дорошенко [и др.] // Здоровоохранение Беларуси. – 1994. – № 12. – С. 20–23.
5. Дорошенко, Е.М. Методологические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях / Е.М. Дорошенко // Сборник тезисов Республиканской научной конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ-2010», Минск, 14–15 мая 2010 г. – Минск, 2010. – С. 126.
6. Дорошенко, Е.М. Методика определения свободных аминокислот и их производных в тканях и биологических жидкостях человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е.М. Дорошенко, Л.И. Нефедов, А.А. Глазев // МВИ. МН 806–98. Утв. БелГИМ, 2008.

Поступила в редакцию 25.11.2011. Принята в печать 28.12.2011

Адрес для корреспонденции: 210038, г. Витебск, Московский пр-т, д. 33, e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.

РЕПОЗИТОРИЙ