

Куколки китайского дубового шелкопряда как источник биологически-активных субстанций и их аналогов для биотехнологии

О.М. Балаева-Тихомирова, Е.О. Данченко, Т.А. Толкачева, А.А. Чиркин
Витебский государственный университет имени П.М. Машерова
e-mail: tanyatolkacheva@mail.ru

Введение. Гидролизаты животных получают *in vivo* (методы аутолиза и гистолиза), а также *in vitro* (кислотный, щелочной, ферментативный гидролиз). Примером гидролизата животных тканей служит гидролизат гепатопанкреаса крабов, а растительного – оксидат торфа. Известны 4 типа гидролизатов, используемых в различных областях биологии и медицины: 1) гидролизаты организмов (чаще гидробионтов), органов или тканей животных и растений; 2) гидролизаты отдельных белков, в частности коллагена. Такие гидролизаты оказывают положительное действие на метаболизм молекул соединительной ткани, (то есть ткани, из которой был выделен белок); 3) по Хавинсону – получение коротких пептидов методами препаративной химии и химического синтеза пептидов, которые имеют выраженную органоспецифическую направленность своего действия; 4) смеси мономеров, полученные при глубоком распаде биополимеров, например, смеси аминокислот, которые используются для синтеза биополимеров (заместительная функция), а также для антиоксидантного и биорегуляторного действия [1].

Продукты распада стимулируют синтез компонентов ткани, из которой получен гидролизат. Так крупные продукты гидролиза белка коллагена (0,5-215 кДа, в среднем 3,3 кДа) увеличивают синтез компонентов соединительной ткани: гликозамингликанов, протеогликанов и агрекана (гидролизат в виде препарата Fortigel, Германия). Гидролизат коллагена содержит 20,6% глицина, 11,3% гидроксипролина, 14% пролина и 1% гидроксизина. Продукты распада печени (до 10 кДа) обладают антиоксидантным и стимулирующим (нормализующим) влиянием на различные функции и структуры печени (препарат Прогепар, РФ). Основным недостатком вышеперечисленных гидролизатов является отсутствие доказательства, что из их компонентов может быть восстановлен организм, орган или биополимер. Поэтому был осуществлен поиск в природе организма, в жизненном цикле которого осуществляется глубокий гистолиз до мономеров и воссоздание нового организма из продуктов гистолиза. Таким объектом оказался китайский дубовый шелкопряд, в жизненном цикле которого имеется стадия куколки. Куколка шелкопряда содержит продукты гистолиза личинки V возраста; молекулы, обеспечивающие сохранность содержимого от микробной контаминации и окислительного стресса; молекулы, обеспечивающие жизнедеятельность клеток имагинальных дисков и иных клеток, необходимых для образования имаго; молекулы, выполняющие регуляторную роль для смены фаз гистолиза на гистогенез. В этом периоде жидкое содержимое куколок, образованное в результате гистолиза тканей гусеницы V возраста, устойчиво к

окислительному стрессу и бактериальной контаминации. Следовательно, в биотехнологии перспективно использовать жидкое содержимое куколок как сырье для получения антиоксидантных, бактериостатических и иммуномодулирующих препаратов. Это выгодно отличает жидкое содержимое куколок от продуктов, обогащенных пептидами и свободными аминокислотами, полученными путем гидролиза различных живых объектов.

Методы исследования. Для биотестирования фракций гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда и модельных смесей аминокислот применяли зерновки ячменя (сорт Гонар). Семена ячменя промывали в дистиллированной воде и помещали на 24 часа в растворы тестируемых растворов. Контрольную группу семян – в дистиллированную воду. Набухшие зерновки раскладывали на фильтровальную бумагу, сворачивали в рулоны и проращивали в термостате при температуре 23 °С. Для учета длины корней и биохимических анализов использовали растения на 7-е сутки.

Рассчитывали среднюю длину корней для каждой луковицы в опытных и контрольных сериях экспериментов. Затем вычисляли общее среднее значение длины для опытной и контрольной серии. В гомогенатах листьев ячменя определяли продукты перекисного окисления липидов с помощью теста с 2-тиобарбитуровой кислотой [2]. Активность каталазы оценивали модифицированным методом, основанным на определении количества H_2O_2 , не разложившегося после инкубации его с каталазой, путем спектрофотометрии окрашенного продукта реакции взаимодействия пероксида водорода с молибдатом аммония. Активность каталазы рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции – $22200 \text{ см}^{-1} \times M^{-1}$ [3]. Принцип определения активности глутатионредуктазы (ГР) заключается в превращении GSSG в GSH в присутствии НАДФН. Кинетику потребления субстрата – НАДФН – регистрировали на спектрофлуориметре SOLAR CM 2203 в течение 2 мин при 340 нм. Активность глутатионредуктазы рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и выражали в мкмоль/мин \times г ткани [4].

Полученный цифровой материал после проверки на правильность распределения вариационных рядов обрабатывали статистически с помощью критерия t Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В результате гистолиза личинок V возраста образуется жидкость, содержащая 14,6 г/л свободных аминокислот. В гемолимфе куколок содержание основных аминокислот (аргинин, гистидин, лизин) составляет 26%. Высокое содержание аргинина и лизина связано с распадом гистонов. На основе антивирусного действия лизина можно предположить его участие в механизмах подавления жизнеспособности клеток на ранних этапах диапаузы. На этапе перехода к гистогенезу лизин и аргинин должны использоваться для синтеза гистонов во вновь формируемых клетках. Их концентрация уменьшается и проявляется действие гистидина с его ростостимулирующими и антиоксидантными эффектами.

Выявлено, что обработка ячменя фракциями гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда, содержащими широкий спектр

аминокислот, приводит к стимуляции роста корней растений. Некоторые фракции способствуют снижению содержания ТБК- реагирующих соединений (ТБКРС) и активности глутатионредуктазы. Модельные смеси аминокислот, созданные на основе аминокислотного состава фракций гемолимфы, оказывают стимулирующий эффект на рост и развитие ячменя, что доказывается увеличением длины корней и обладают антиоксидантным действием, о чем свидетельствует уменьшение содержания ТБКРС и активности каталазы. Показано, что для стимуляции роста и развития злаковых, целесообразно использовать смесь аминокислот, содержащую глутаминовую кислоту, серин, глицин, треонин, аргинин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, лизин, пролин.

Заключение. Таким образом, в природе был найден объект с уникальной эндогенной антиоксидантной системой, образованной в процессе гистолиза тканей, содержимое которого может быть использовано для получения антиоксидантных, бактериостатических и иммуномодулирующих препаратов и по составу которого могут быть созданы композиции с антиоксидантным и ростостимулирующим действием.

Список использованных источников

1. Тутельян, В.Л. Короткие пептиды как компоненты питания: молекулярные основы регуляции гомеостаза / В.Л. Тутельян [и др.]// Успехи совр. биол.– 2014. – №3. – С.227-235.
2. Dipierro, S. The Ascorbate System and Lipid Peroxidation in Stored Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers / S. Dipierro, S.D. Leonardis // J. Exp. Bot. – 1997. – Vol. 48. – P. 779-783.
3. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / Королюк М.А. [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16-19
4. Радюк, М.С. Влияние низкой положительной температуры на активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / М.С. Радюк [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2008. – № 4. – С. 67– 70.