

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ТКАНЯХ ОРГАНОВ ПЧЕЛ КАК ПОКАЗАТЕЛЯ УРОВНЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

И. В. Сердюченко¹, Н. Н. Гугушвили²

¹ Доцент, кандидат ветеринарных наук, ФГБОУ ВО «КубГАУ им. И. Т. Трубилина», г. Краснодар, Россия, e-mail: serd-ira2013@yandex.ru

² Профессор, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «КубГАУ им. И. Т. Трубилина», г. Краснодар, Россия

РЕЗЮМЕ

Предложена новая методика определения содержания гликогена в тканях органов пчел, которая значительно отличается от существующих. Применяемый в настоящее время колориметрический метод по Хорейши является длительным и трудоемким, а кроме того, затратным, так как стоимость основного реактива – орцина – довольно высока. Сравнение экономической эффективности двух методов показало, что предлагаемая методика позволяет сократить затраты за счет использования более доступного и недорогого резорцина вместо орцина и сокращения общего времени проведения исследования с 4 до 3 ч 5 мин. Анализ содержания гликогена по усовершенствованной методике проведен на пчелах четырех пород: итало-карпатской, карпатской, приокской, серой горной кавказской. Установлено, что самые высокие показатели гликогена были у пчел приокской породы. Известно, что чем выше содержание гликогена в органах и тканях, тем лучше энергетический обмен у насекомых. Следовательно, пчелы приокской породы обладают более высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных погодных условий и, как следствие, имеют возможность воспроизводства потомства с более высоким иммунитетом. Таким образом, приведенный метод определения уровня гликогена в тканях органов пчел повышает точность диагностирования, играет в целом очень важную роль для определения уровня энергетического обмена насекомых и будет полезен для использования в области пчеловодства.

Ключевые слова: пчела, гликоген, ткани органов пчел, биохимические исследования, энергетический обмен.

UDC 638.124.2:591.11

DETERMINATION OF GLYCOGEN IN BEE ORGAN TISSUES AS AN ENERGY METABOLISM PARAMETER

I. V. Serduchenko¹, N. N. Gugushvili²

¹ Associate Professor, FGBEI HE "Kuban State Agrarian University n. a. I. T. Trubilin", Krasnodar, Russia, e-mail: serd-ira2013@yandex.ru

² Professor, Doctor of Science (Biology), FGBEI HE "Kuban State Agrarian University n. a. I. T. Trubilin", Krasnodar, Russia

SUMMARY

New method of glycogen determination in bee organ tissues, considerably different from the existing ones, was suggested. Ghoreishi's colorimetric method used today is time-, labor- and cost-consuming as the major reagent – orcin – is quite expensive. Comparison of cost-effectiveness of the two methods demonstrated that the proposed technique makes it possible to reduce expenses by using a more available and less expensive resorcin instead of orcin and reducing total test time from 4 to 3 hours 5 minutes. Glycogen contents determination using the updated method was performed in bees of four breeds: Italian-Carpathian, Carpathian, Oka, gray Caucasus mountain honeybees. It was determined that the Oka honeybees demonstrated the highest glycogen level. It is known that the higher is glycogen contents in organs and tissues the better is energy metabolism in insects. Consequently, honeybees of Oka breeds have higher resistance to unfavorable weather conditions and can produce progeny with a higher level of immunity. So, the specified method of glycogen determination in bee organ tissues increases the accuracy of diagnosis and plays a very important role in determining the level of energy metabolism in insects and will be useful for apiculture.

Key words: bee, glycogen, bee organ tissues, biochemical tests, energy metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

Гликоген – полисахарид, или животный крахмал, который синтезируется организмом и депонируется во всех его органах и тканях [3, 4]. Гликоген является легкокомбинируемой резервной формой глюкозы и представляет собой разветвленный полимер из остатков глюкозы крови [2, 7].

Существует несколько способов определения гликогена в крови: ШИК-реакция (полисахариды выявляются в результате реакции, окисляющей спиртные группы, которые преобразуются в альдегидные группы, и отожествления последних путем цветной реакции реактивом Шиффа), метод Шабадаша (при котором периодат калия окисляет гликоген с образованием альдегидных соединений, легко реагирующих с реактивом Шиффа, в местах локализации гликогена выявляется вишнево-фиолетовое окрашивание), колориметрический метод с орцином по Хорейши (гликоген осаждают спиртом, гидролизуют в кислой среде до глюкозы и нагревают в серной кислоте, которая превращается в оксиметилфурфурол, конденсируясь с орцином и образуя окрашенное соединение) [2, 3, 7].

Недостатками данных методов являются: трудоемкий длительный процесс, не вполне точное определение содержания гликогена в крови, а также невозможность определения его уровня в тканях органов у пчел. Для повышения точности диагностирования, уменьшения временных и материальных затрат необходимо усовершенствование методики определения гликогена, применяемой в пчеловодстве.

Таким образом, разработка метода определения содержания гликогена в тканях органов пчел является одной из актуальных задач в пчеловодстве, так как гликоген является важным показателем энергетического

Таблица 1
Показатели экстинции

Группы пчел	Экстинция проб	
	E_{on}	$E_{ст}$
1-я группа (итало-карпатская порода)	0,438	0,256
2-я группа (карпатская порода)	0,584	0,251
3-я группа (приокская порода)	0,950	0,301
4-я группа (серая горная кавказская порода)	0,566	0,253

Рис. 1. Показатели экстинции проб

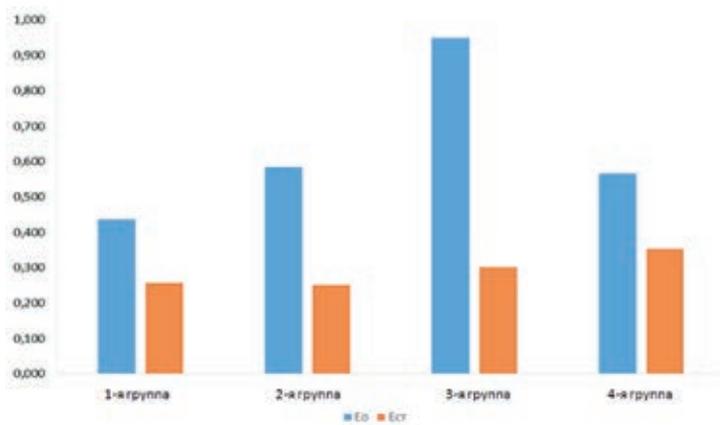
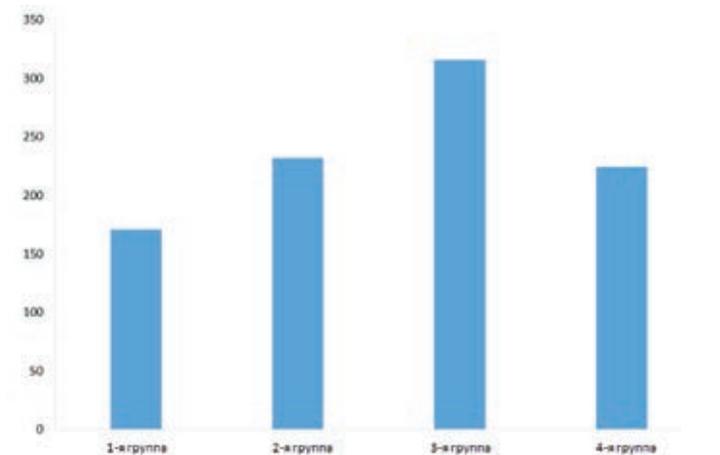


Таблица 2
Содержание гликогена в экстрактах из органов и тканей пчел

Группы пчел	Количество гликогена, мг%
1-я группа (итало-карпатская порода)	171,0
2-я группа (карпатская порода)	232,0
3-я группа (приокская порода)	316,0
4-я группа (серая горная кавказская порода)	224,0

Рис. 2. Содержание гликогена в пробах



ресурса организма насекомого [5, 6]. Целью исследования явилось определение уровня гликогена в тканях органов у пчел различных пород.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследований было создано 4 группы из пчел разных пород (итало-карпатской, карпатской, приокской, серой горной кавказской) по 10 насекомых в каждой.

Исследование состояло из следующих этапов.

Подготовка экстракта из органов и тканей пчел.

С помощью пинцета и глазных ножниц у пчел удаляли наружный покров и кишечник. Ткани и органы, полученные от десяти пчел, растирали в фарфоровой ступке, добавляя физиологический раствор (1:1). Затем суспензию выдерживали в холодильнике при +5 °С в течение 1,0–1,5 ч и фильтровали через бумажный фильтр.

Приготовление растворов. Готовили 1%-й раствор резорцина на 52%-й серной кислоте; 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты, растворяя навеску 5 г в 99 мл дистиллированной воды. Для получения стандартного раствора 10 мг глюкозы растворяли в 300 мл дистиллированной воды.

Осаждение и гидролиз гликогена из экстракта органов и тканей пчел. 0,3 мл отфильтрованного экстракта из тканей пчел помещали в центрифужную пробирку, вносили 0,2 мл дистиллированной воды и 0,2 мл 30%-го раствора гидроксида натрия. Затем пробирку помещали в кипящую водяную баню на 1,5 ч, охлаждали, вносили 1 мл 96%-го этилового спирта, перемешивали, охлаждали на льду в течение 15 мин и центрифугировали при 3000 г в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 1 мл 96%-го этилового спирта, ресуспендировали, охлаждали на льду в течение 15 мин и вновь центрифугировали при 3000 г в течение 15 мин. Надосадочную жидкость осторожно убирали, осадок ресуспендировали в 3 мл дистиллированной воды, добавляли 13 мл 52%-го раствора серной кислоты, 2 мл 1%-го резорцина и перемешивали.

Определение содержания гликогена. В контрольную (чистую) пробирку и пробирку со стандартным раствором глюкозы добавляли по 3 мл дистиллированной воды и по 13 мл 52%-го раствора серной кислоты, перемешивали и вносили по 2 мл 1%-го раствора резорцина.

Все пробирки помещали в водяную баню на 20 мин при температуре 80 °С, затем охлаждали на льду в течение 15 мин. Пробирки, содержащие глюкозу, имели коричнево-желтое окрашивание.

Фотокolorиметрирование проводили против контроля на КФК-3 при длине волны $\lambda = 315$ нм.

Расчет содержания гликогена в полученном экстракте проводили по формуле

$$\Gamma = \frac{E_{on}}{E_{ст}} \times 100,$$

где Γ – количество гликогена, мг%;

E_{on} – экстинция опытной пробы;

$E_{ст}$ – экстинция стандартного раствора.

Расчет экономической эффективности предложенного метода проводили по общепринятым формулам расчета затрат на проведение мероприятий, которые складываются из стоимости трудовых и материальных ресурсов, использованных на проведение исследований [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сводные данные по определению экстинции приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Во всех четырех группах пчел определяемый показатель заметно варьировал. Из полученных результатов исследований видно, что самым высоким он (как в опытной пробе, так и в стандартном растворе) был среди пчел приокской породы и составил 0,950 и 0,301 соответственно. Самый низкий уровень экстинции показали пчелы итало-карпатской породы: 0,438 – в опытной пробе и 0,256 – в стандартной.

Содержание гликогена в полученных экстрактах рассчитывали по всем группам пчел. Сводные данные представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

Из приведенных данных видно, что разные породы пчел имеют неодинаковый уровень содержания гликогена и, следовательно, различные энергетические ресурсы. Это обусловлено, прежде всего, разными видowymi особенностями организма пчел.

Из всех четырех групп самые высокие показатели гликогена были определены у пчел 3-й группы – приокской породы. Следовательно, насекомые данной породы обладают наибольшими энергетическими ресурсами в сравнении с остальными, обладают повышенной устойчивостью к воздействию неблагоприятных погодных условий и имеют возможность воспроизводства потомства с повышенным уровнем иммунитета.

Также был проведен расчет экономической эффективности представленной методики в сравнении с наиболее часто применяемой методикой определения гликогена с орцином по Хорейши (табл. 3).

Приведенные в таблице 3 данные показывают, что высокая экономическая эффективность предлагаемой методики достигается за счет:

- уменьшения времени охлаждения после кипячения на водяной бане с 30 до 15 мин за счет быстрого охлаждения в морозильной камере;
- уменьшения количества центрифугирований;
- использования более доступного и недорогого реагента вместо орцина;
- сокращения общего времени проведения исследования с 4 ч до 3 ч 5 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый способ является доступным, простым в исполнении, дает возможность быстрого определения содержания гликогена в тканях органов пчел в сравнении с известными методами определения содержания гликогена в крови животных.

Предложенный метод позволяет рассчитать содержание гликогена в экстракте из органов и тканей пчел и, как следствие, определить уровень энергетического обмена организма пчел разных пород с целью определения породы, наиболее устойчивой к воздействию различных неблагоприятных факторов, и породы, способной воспроизводить более сильное потомство.

Рассмотренная методика является более экономичной в сравнении с существующими методиками определения гликогена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононов А. Н., Симонов А. Н. Экономика ветеринарных мероприятий: рабочая тетрадь для проведения лаб.-практ. занятий. – Ставрополь, 2012. – 36 с.

Таблица 3
Экономическая эффективность методики определения гликогена в тканях органов пчел

Показатели	Методика определения по Хорейши	Методика определения гликогена в тканях органов пчел
Количество проводимых центрифугирований при 3000 г в течение 15 мин	3	2
Основной используемый химический реактив	Орцин 1%	Резорцин 1%
Стоимость реактива за 1 кг, руб.	3960	723
Общее время проведения исследования	4 ч	3 ч 5 мин

2. Момот Ю. А. Содержание гликогена в железистом эпителии серозных желез // Ученые записки КГАВМ. – 2012. – Т. 210. – С. 133–136.

3. Пат. 1270704 СССР, МПК G01N 33/48. Способ определения гликогена в тканях животных / Ю. А. Колос, В. Я. Шаблий, В. П. Сапейко, В. Н. Глушенко; Украинский научно-исследовательский ветеринарный институт. – 3780292/28-14; заявл. 15.08.84; опубл. 15.11.86.

4. Связывание гликогенфосфорилазы *b* и киназы фосфорилазы с гликогеном в условиях молекулярного краудинга. Ингибирующий эффект FAB / Н. А. Чеботарева, А. В. Меремьянин, В. Ф. Макеева [и др.] // Биохимия. – 2009. – Т. 74, вып. 5. – С. 691–698.

5. Сердюченко И. В., Тараненко Е. А. Взаимосвязь состояния кишечника пчел с их физиологической активностью // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: материалы 72-й науч.-практ. конф. преподавателей по итогам НИР за 2016 г. – Краснодар, 2017. – С. 191–192.

6. Статистический анализ комплекса признаков пчел серой горной кавказской породы / Л. Я. Морева, И. А. Морев, А. В. Абрамчук [и др.] // Труды Русского энтомологического общества. – Санкт-Петербург, 2013. – Т. 84, № 1. – С. 29–33.

7. Zea C. J., MacDonell S. W., Pohl N. L. Discovery of the archaeal chemical link between glycogen (starch) synthase families using a new mass spectrometry assay // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125, No. 45. – P. 13666–13667.

REFERENCES

1. Kononov A. N., Simonov A. N. Economy of Veterinary Measures: activity book for laboratory practicum [Ekonomika veterinarnykh meroprityatij: rabochaya tetrad' dlya provedeniya lab.-prakt. zanyatij]. Stavropol; 2012 (in Russian).

2. Momot Yu. A. Glycogen contents in glandular epithelium of serous glands [Soderzhanie glikogena v zhelezistom epiteliy seroznykh zhelez]. *Uchenye zapiski KGAVM*. 2012; 210: 133–136 (in Russian).

3. Pat. 1270704 USSR, MPK G01N 33/48. Method of glycogen determination in animal tissues [Sposob opredeleniya glikogena v tkanyah zhivotnykh]. Yu. A. Kolos, V. Ya. Shabliy, V. P. Sapeiko, V. N. Glushenko; Ukrainian Scientific and Research Veterinary Institute. 3780292/28-14; submitted on 15.08.84; published 15.11.86 (in Russian).

4. Chebotareva N. A., Meremyanin A. V., Makeyeva V. F. et al. Binding of glycogen phosphorylase *b* and phosphorylase kinase to glycogen under "molecular crowding" conditions. FAB inhibitory effect [Svyazyvanie glikogenfosforilazy *b* i kinazy fosforilazy s glikogenom v usloviyakh molekulyarnogo kraudinga. Ingibiruyushchij effekt FAB]. *Biokhimiya*. 2009; 74 (5): 691–698 (in Russian).

5. Serduchenko I. V., Taranenko Ye. A. Influence of bee intestine condition on their physiological activity [Vzaimosvyaz' sostoyaniya kishchechnika pchel s ih fiziologicheskoy aktivnost'yu]. *Nauchnoe obespechenie agropromyshlennogo kompleksa: Materialy 72-j nauch.-prakt. konf. predavatelej po itogam NIR za 2016 g.* Krasnodar; 2017: 191–192 (in Russian).

6. Moreva L. Ya., Morev I. A., Abramchuk A. V. et al. Statistic analysis of gray Caucasus mountain honeybee characteristics [Statisticheskij analiz kompleksa priznakov pchel seroj gornoj kavkazskoj porody]. *Trudy Russkogo ehntomologicheskogo obshchestva*. Saint-Petersburg; 2013; 84 (1): 29–33 (in Russian).

7. Zea C. J., MacDonell S. W., Pohl N. L. Discovery of the archaeal chemical link between glycogen (starch) synthase families using a new mass spectrometry assay. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125(45): 13666–13667.

Поступила 16.02.18
Принята в печать 28.05.18