

6. Мухина О.Ю., Злотин А.З., Головкин В.А. Биологические основы применения при культивировании насекомых. – Х.: РИП «Оригинал», 1997. – 84 с.

7. Повышение продуктивности тутового шелкопряда при подкормке хлорнокислым аммонием / И.Т.Депешко, А.З.Злотин, О.М.Журавель, Л.В. Куприянов // Шелководство. – 1976. – № 4. – С. 9–10.

8. Повышение продуктивности тутового шелкопряда при подкормке хлорнокислым аммонием / И.Т.Депешко, А.З.Злотин, О.М.Журавель, Л.В. Куприянов // Химия в сельском хозяйстве. – 1980. – Т. 23. – С. 60–61.

9. Депешко И.Т. Обмін азотистих та фосфорних сполук у сіянцях та саджанцях шовковиці // Шовківництво. – К.: Урожай, 1970. – Вип. 6. – С. 8–17.

10. Депешко И.Т., Ковалик А.И. Вплив кормової якості листя шовковиці на продуктивність шовковичного шелкопряда різного віку за сезонами вигодовування // Шовківництво. – К.: Урожай, 1980. – Вип. 13. – С. 17–23.

В статье приведены результаты изучения влияния подкормки гусениц IV-V возрастов в летнюю выкормку соком листьев шелковицы, приготовленного в весенний период вегетации на биологические показатели тутового шелкопряда

In clause the results of study of influence of feeding of caterpillars IV-V instars in years summer rearing by juice from leaves of mulberry of a spring operation on biological parameters of silkworm (Bombyx mori L.) are resulted.

УДК 577.112.384:591.044

СПРЯМОВАНИЙ ПОШУК ОРИГІНАЛЬНИХ КРІОКОНСЕРВАНТІВ НОВОГО ПОКОЛІННЯ

В.І.Кабачний, Н.І.Горбунова,
Національний фармацевтичний університет
Л.В.Горбунів
Інститут тваринництва УААН

Проведено біологічний скринінг похідних гетерозидів (ПГ) на виявлення кріозахисних властивостей на моделі кріоконсервації сперматозоїдів бугая. Встановлено, що додавання ПГ до кріозахисного середовища підвищує активність сукцинатдегідрогенази та γ -глутамілтрансферази в сперматозоїдах і знижує вихід актозину з клітин у сім'яну плазму після проведення циклу заморожування-відтавання. Крім того, гетерозиди проявляють репаративні властивості, підвищуючи активність ферментів, які були інактивовані при охолодженні.

**похідні гетерозидів, сперматозоїди, кріоконсервація,
сукцинатдегідрогеназа, γ -глутамілтрансфераза, акрозин.**

Підвищення збереженості біологічного матеріалу до дії кріогенних факторів на сьогодні залишається актуальною проблемою у репродуктивній біотехнології. Серед існуючого різноманіття способів низькотемпературного заморожування, які включають еквілібрацію біооб'єкта з кріопротектором, вибір складу кріозахисних середовищ, оптимізацію фізико-хімічних характеристик заморожування та удосконалення апаратного забезпечення процесу кріоконсервації, ні один із них не дає змогу одержати деконсерво-

вані клітини з повністю відновленими морфо-функціональними характеристиками. Це цілком відноситься і до сперми, яка після проведення циклу заморожування-відтавання під дією фізичних [1] та біохімічних [2] факторів частково лишається запліднювальною здатністю.

У раніше проведених нами дослідженнях встановлені біохімічні критерії підвищення стійкості спермій до гіпотермії та кріоконсервації і сформульовані теоретичні основи направлено пошуку кріоконсервантів нового покоління [3]. Продовжуючи вказані дослідження виникла доцільність експериментально перевірити зазначені у роботі [3] допущення.

Об'єктом дослідження слугували похідні гетерозидів (ПГ), синтезовані на кафедрі фізичної та колоїдної хімії Національного фармацевтичного університету (м.Харків), які проявили цитопротекторну активність та здатність впливати на енергетичні процеси у тканинах тварин [4].

Матеріали та методи дослідження. Досліджували сперму бугая. Бякулят однієї тварини (кількість зразків $n=7$, по два повтори) розбавляли глюкозо-цитратно-жовтковим середовищем, яке містило гліцерин як кріопротектор. Концентрація сперматозоїдів у суспензії становила 20 млн. клітин/мл. Суспензію нативних сперматозоїдів інкубували при 37°C протягом 30 хв з ПГ з кінцевою концентрацією в середовищі від 10^{-2} до 10^{-8} М і за показником рухливості клітин визначали ефективні концентрації речовин. Рухливість оцінювали за допомогою мікроскопа «Axiovert 35» (Германія) при збільшенні $\times 400$ як відношення кількості клітин, що рухаються прямо-лінійно та поступально до загальної їх кількості та виражали у відсотках.

Речовини добавляли до суспензії клітин з кріопротектором, інкубували при 37°C протягом 30 хв., після чого зберігали при 4°C протягом 3 год. і заморожували за стандартною методикою [5]. Відігрівання здійснювали на водяній бані при 40°C . Контрольні зразки не містили добавок речовин.

Сперматозоїди виділяли методом диференційного центрифугування при 1000 об./хв. протягом 10 хв., супернатант відділяли, а осад клітин відмивали і ресуспендували у буфері Тіроде (рН 7,2). Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) у мітохондріях, γ -глутамілтрансферази (γ -ГТ) в суспензії сперматозоїдів визначали калориметричним методом [6, 7]. Активність акрозину у сім'яній плазмі оцінювали нефелометричним методом за кількістю залишкового казеїну, який не розчепився під дією ферменту [8], кількість білка у зразку - біуретовим методом, використовуючи набір «Агат» (Росія). Активність ферментів оцінювали в суспензії нативних та відігрітих після кріоконсервації сперматозоїдів. Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакета статистичних програм за критерієм Фішера.

Результати та обговорення. Біологічний скринінг речовин проводили, досліджуючи їх вплив на рухливість сперматозоїдів. Були тестовані більш ніж 20 речовин, серед яких найбільший ефект зафіксований для 7-метил-N-малеогетерозиду (K321) та N-малеогетерозиду (K322) відповідно до концентрацій 10^{-8} М та 10^{-7} М (рис.1). При цьому, під дією зазначених речовин рухливість нативних сперматозоїдів підвищилась відповідно на 18,2 і

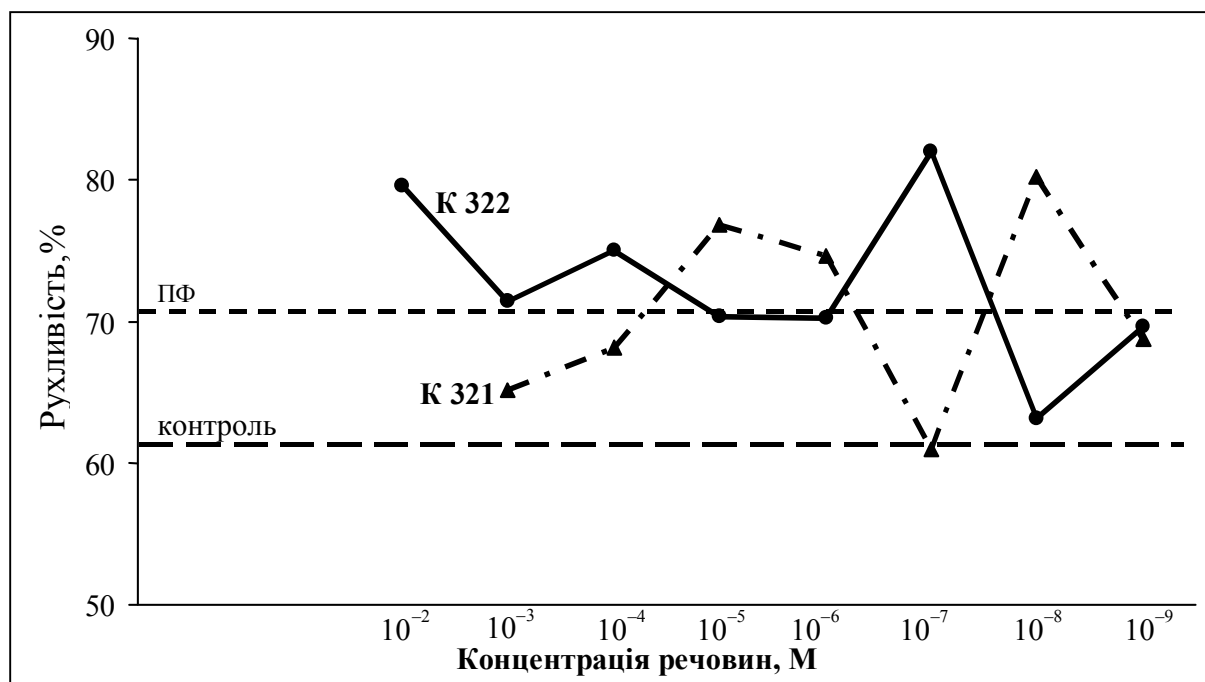


Рис. 1. Залежність рухливості нативних сперматозоїдів від концентрації К321 та К322

20% у порівнянні з контролем. Після інкубації деконсервованих сперматозоїдів з К321 і К322 рухливість збільшилась відповідно на 11,9 і 15,8% (табл. 1) у порівнянні з деконсервованим контролем.

Для виявлення кріозахисних властивостей гетерозидів К321 і К322 у цих же концентраціях були добавлені до суспензії сперматозоїдів перед заморожуванням. Після відігріву рухливість клітин також перевищувала контроль відповідно на 11,78 і 15,15% (табл.1).

1. Вплив похідних гетерозидів на рухливість деконсервованих сперматозоїдів бугая, $M \pm m$

Показник	Контроль	ПГ додані до кріоконсервації		ПГ додані після кріоконсервації	
		К321	К322	К321	К322
Рухливість, %	$35,40 \pm 1,77$	$47,18 \pm 2,15^*$	$50,55 \pm 2,43^*$	$47,3 \pm 2,15^*$	$51,2 \pm 2,43^*$

Примітка: * - відмінність вірогідна у порівнянні з контролем, $p < 0,01$

Таким чином, на відміну від раніше досліджених метилксантинів [9], ПГ не тільки відновлюють функціональну активність деконсервованих сперматозоїдів, але й мають виражену кріозахисну активність, проява якої при концентраціях речовин 10^{-7} – 10^{-8} М вказує на те, що механізм дії гетерозидів суттєво відрізняється від такого для традиційних кріопротекторів, що входять до складу кріозахисних середовищ у значно вищих концентраціях.

Для встановлення біохімічних механізмів кріозахисної дії гетерозидів дослідили їх вплив на активність ферментів енергозабезпечення (СДГ), транспорту амінокислот (γ -ГТ), та активність акрозину, що приймає участь при заплідненні ооцита. У табл. 2 наведені результати дослідження актив-

ності зазначених ферментів до і після проведення циклу заморожування-відтавання сперматозоїдів у стандартному кріозахисному середовищі та середовищі, до складу якого входить K321.

2. Вплив добавки K321 до стандартного кріозахисного середовища на активність СДГ, γ -ГТ та акрозина в деконсервованих сперматозоїдах та сім'яній плазмі (кріопротекторний ефект), $M \pm m$

Фермент	Контроль		Деконсервовані (у кріозахисному середовищі з K321)
	нативні	деконсервовані (у стандартному кріозахисному середовищі)	
СДГ, мМ/мг білка·хв.	5,39 $\pm$ 1,19	0,61 $\pm$ 0,04*	2,79 $\pm$ 0,14**
γ -ГТ, мккатал/л	7,95 $\pm$ 0,85	2,76 $\pm$ 0,14*	6,48 $\pm$ 0,32**
Акрозин, мг/мл (по залишку казеїну)	2,40 $\pm$ 0,44	0,70 $\pm$ 0,07*	1,68 $\pm$ 0,08*

Примітка: * - відмінність вірогідна у порівнянні з нативним контролем, $p < 0,05$;

** - у порівнянні з деконсервованим контролем, $p < 0,05$.

Встановлено, що в контрольному зразку в деконсервованих клітинах спостерігалось зниження активності всіх ферментів. Найбільша інактивація спостерігалась для СДГ – активність ферменту понизилась на 4,78 мМ/мг білка·хв., тобто на 88,7% від початкової. Активність γ -ГТ зменшилась на 5,19 мккатал/л, тобто на 65,3% від початкової. У той же час, активність акрозину у сім'яній плазмі, оцінена по зменшенню кількості розщепленого казеїну ферментом на 1,7 мг/мл, підвищилась на 70,8%. Після заморожування сперматозоїдів у середовищі з K321 спостерігалось підвищення активності ферментів у деконсервованих клітинах. При цьому активність СДГ була на 2,09 мМ/мг білка·хв (на 357%), та активність γ -ГТ на 3,72 мккатал/л (на 57%) вищою, ніж у контрольних зразках, які були заморожені у стандартному кріозахисному середовищі. Активність акрозину у сім'яній плазмі зменшилась на 240%, що відповідає збільшенню кількості казеїну на 0,98 мг/л сім'яної плазми.

Дослідженням встановлено, що при зберіганні сперматозоїдів у кріозахисному середовищі з добавкою K321 активність всіх досліджуваних ферментів вища, ніж у контролі. Проведений кореляційний аналіз вказує на наявність прямо пропорційного зв'язку між активністю СДГ та рухливістю як нативних, так і деконсервованих сперматозоїдів ($r=0,97$ і $r=0,92$ відповідно). Таким чином, підвищення енергопродукції в сперматозоїдах може бути одним із шляхів, здатних впливати на збереженість морфо-функціональних характеристик деконсервованих клітин. Збільшення кількості казеїну у сім'яній плазмі, не розщепленого акрозином, слід розглядати як наслідок зменшення проникності цитоплазматичної мембрани в області акросоми при дії K321 та зниження вивільнення фермента з клітин. У той же час синхронне підвищення активності γ -ГТ в суспензії клітин – ферменту, що характеризує не тільки стан цитоплазматичної мембрани сперматозоїдів [7],

але й біосинтез білка у клітинах [10], свідчить про протікання репаративних процесів у сперматозоїдах.

Для підтвердження можливої участі ПГ у репаративних процесах заморожені в стандартному кріозахисному середовищі сперматозоїди після відігріву інкубували з речовинами (табл. 3).

3. Вплив похідних гетерозидів на активність СДГ, γ -ГТ та акрозина після інкубації деконсервованих сперматозоїдів з речовинами, $M \pm m$

Фермент	Контроль	K321	K322
СДГ, мМ/мг білка·хв.	0,61 $\pm$ 0,04	1,88 $\pm$ 0,09*	1,86 $\pm$ 0,10*
γ -ГТ, мккатал/мл	2,76 $\pm$ 0,14	6,48 $\pm$ 0,31*	4,89 $\pm$ 0,26*
Акрозин, мг/мл (по залишку казеїну)	0,70 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,04*	1,12 $\pm$ 0,07*

Примітка: * - відмінність вірогідна у порівнянні з контролем, $p < 0,05$.

Встановлено, що K321 та K322 підвищили активність СДГ відповідно на 1,27 та 1,25 мМ/мг білка·хв, що на 208,20 та 204,92% вище, ніж у контрольному зразку, γ -ГТ – на 3,72 та 2,13 мккат/л, що на 134,78 та 77,17% вище від контролю, у той час, як кількість казеїну у сім'яній плазмі підвищилась відповідно на 0,4 та 0,42 мг/мл, що відповідає зменшенню активності акрозину відповідно на 57,14 та 60,0% у порівнянні з контролем.

Підвищення активності ферментів може бути не тільки результатом безпосереднього впливу речовин, але й відображати прискорення процесів синтезу, на що вказує активація γ -ГТ та зменшення проникності мембран до вивільнення акрозину з клітин.

Висновки:

1. Експериментальним шляхом підтверджені теоретичні положення та перспективність направлено пошуку кріоконсервантів нового покоління серед біологічно активних речовин, що здатні впливати на ферментні системи енергозабезпечення і транспорту пластичного матеріалу в клітинах.

2. У якості добавок до стандартних кріозахисних середовищ запропоновані оригінальні речовини – гетерозиди, які проявляють виражені кріозахисні властивості. Визначено інтервал оптимальних концентрацій гетерозидів та умови їх застосування в технології низькотемпературної консервації сперми великої рогатої худоби.

Бібліографічний список

1. Lutze J.L., Roden J.S., Bryant G. Cellular cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. Int. J. of Refrig. 2001, №24, P.438-450.
2. Chatterjee S., Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergo colling, freezing and thawing. Mol. Reprod. Dev. 2001, Vol.59, №4, P.451-458.
3. Кабачний В.И., Горбунова Н.И., Антоненко Т.С. Производные гетерозидов – криопротекторы нового поколения //Тез доп. на I Всеукраїнській наук.-практ. конф. "Біотехнологія. Освіта. Наука".- К., 2003.- С.85.

4. Кабачный В.И. Синтез и биологическая активность гетерилсукци-
наминовых кислот и их производных: Дис...канд. фарм.н./Х.,1981.-207 с.

5. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спер-
мы быков-производителей: Метод. рек. /Под ред. Ф.И.Осташко.-Х.,1990.-47 с.

6. Современные методы в биохимии /Под ред. В.Н.Ореховича.-М.:
Медицина, 1977.-С 46-47.

7. Неймарк А.И., Алиев Р.Т. Значение исследования энзимов спермальной
плазмы в патогенезе относительного мужского бесплодия // Урология.-2000.-№3.-
С.34-37.

8. Thecova E., Petrova K., Grinco M., Georgiev G.S. Effect of ultra low
temperatyrres on the acrosomal proteins of bull and ram spermatozoa . Vet. Med.
Nauki.1983, Vol.20, №5-6, P.105-109.

9. Gradil C.M., Ball B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of
cryopreserved equine spermaeozoa. Theriogenolody.2000, Vol.54., №7, P.1041-1047.

10. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии .- М.: Мир,
1989.-Т.1.-692с.

*Проведен биологический скрининг производных гетерозидов (ПГ) на обнаружение
криозащитной активности на модели криоконсервации сперматозоидов быка. Установле-
но, что добавление ПГ в криозащитную среду повышает активность сукцинатдегидроге-
назы и γ -глутамилтрансферазы в сперматозоидах и понижает выход акрозина из клеток
в семенную плазму после проведения цикла замораживания-оттаивания. Кроме того, ПГ
проявили репаративные свойства, повышая активность ферментов, инактивированных
охлаждением.*

*Biological screening of heterozide derivatives on detection of cryopropetive properties
of substances on bull spermatozoa cryopreservation model is carried out. It is established,
that addition of heterozide derivatives into cryoprotective medium raises the safety of
succinate dehydrogenase and γ -glutamyl transferase activity in spermatozoa and reduce
acrosine output from cells to semen plasma after freezing-thawing. Besides heterozide
derivatives are restore of enzymes activity, which were inactivated at cooling.*

УДК 638.26

ДЕЗОРІЄНТАЦІЯ САМЦІВ ШОВКОВИЧНОГО ШОВКОПРЯДА СТАТЕВИМ ФЕРОМОНОМ САМОК

О.О. Калініна, О.З. Злотін
Інститут шовківництва УААН

*Запропоновано удосконалення вагового методу поділу коконів шовковичного
шовкопряда за статтю з використанням методу дезорієнтації самців статевим
феромоном самок при засміченні групи самок самцями, яке не перевищує 10% та при
використанні невизначеної групи коконів, що дає змогу достовірно зменшити
засмічення гібридної греди чистопородною.*

**гібридна грена, кокони-самців, кокони-самок, засмічення гібридної
греди чистопородною, бомбікол, метод дезорієнтації**

Існуюча технологія сучасного шовківництва передбачає проведення
промислових вигодівель тільки з гібридної греди, що забезпечує отримання
ефекту гетерозису [3]. Однак існуючий спосіб приготування гібридної гре-