



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52573 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/554

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ

1

(21) u201004098

(22) 08.04.2010

(24) 25.08.2010

(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.

(72) СТРАШНЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ, УСА-
ЧОВ АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-
ТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

(57) Спосіб визначення активності біологічно акти-
вної речовини (БАР), що передбачає дослідження
впливу БАР на ріст соматичних клітин *Drosophila*
melanogaster Meig., який **відрізняється** тим, що
спочатку готують живильне середовище з дода-

2

ванням БАР із заданою (дослід) та нульовою (кон-
троль) концентраціями, потім на приготованому
живильному середовищі вирощують личинок дро-
зофіли і наприкінці 3-ї стадії розвитку у личинок
виділяють слинні залози, з яких готують давлені
ацетоорсеїнові препарати політених хромосом,
після чого на цих препаратах визначають відсот-
ковий розподіл ядер з різним ступенем політенії
хромосом (СПХ), що розрізняють за шириною
хромосом та інтенсивністю забарвлення ацетоор-
сеїном, після чого розраховують середні значення
СПХ і за різницею між середніми значеннями СПХ
у досліді та контролі судять про активність БАР.

Корисна модель відноситься до галузі ентомо-
логії і може бути використана у сучасних методах
визначення активності біологічно активних речо-
вин (БАР), зокрема, гормонів та вітамінів, що регу-
люють розвиток комах і використовуються у бджі-
льництві та шовківництві [1], а у неоптимальних
концентраціях діють як інсектициди і застосову-
ються у боротьбі з комахами-шкідниками та екто-
паразитами тварин [2].

Відомі способи визначення активності БАР за-
сновані на тому, що при зміні складу живильного
середовища, наприклад, при вилученні з нього або
введенні додаткової сполуки, організм через дея-
кий час подає відповідний сигнал. Встановлення
зв'язку між характером та інтенсивністю цього сиг-
налу організму, який називають індикаторним, з
кількістю введенного в середовище або виключено-
го з нього компоненту використовують для визна-
чення його активності. Аналітичними індикаторами
у біологічних методах є різні живі організми, їх ор-
гани, тканини, клітини, фізіологічні функції, біохімі-
чні реакції, тощо [3, 4].

Найближчим аналогом способу, що заявля-
ється, є спосіб визначення активності біологічно
активних речовин, що передбачає дослідження
впливу БАР на ріст соматичних клітин дрозофіли
[4].

При реалізації означеного способу використо-
вують здатність БАР при певних концентраціях
специфічно впливати на ріст диплоїдних ембріо-

нальних клітин дрозофіли, що тривалий час пере-
сиваються.

Недоліками найближчого аналогу є складність
культивування клітин комах *in vitro*, що потребує
коштовного обладнання, стерильних умов та бага-
токомпонентного живильного середовища, а також
можливі відмінності дії БАР в умовах *in vivo* та *in*
vitro.

Технічною задачею корисної моделі є вдоско-
налення способу визначення активності БАР за-
вдяки спрощенню його виконання та підвищенню
достовірності результату, зокрема, використовую-
чи у якості індикаторного організму класичного
об'єкту генетичних досліджень *Drosophila*
melanogaster Meig.

Поставлена задача вирішується тим, що у
способі обраному за найближчий аналог, що пе-
редбачає дослідження впливу БАР на ріст сомати-
чних клітин *Drosophila melanogaster* Meig, згідно з
корисною моделлю, спочатку готують живильне
середовище з додаванням БАР із заданою (дос-
лід) та нульовою (контроль) концентраціями, потім
на приготованому живильному середовищі ви-
рощують личинок дрозофіли і наприкінці 3-ї стадії
розвитку у личинок виділяють слинні залози, з яких
готують давлені ацетоорсеїнові препарати полі-
тених хромосом, після чого на цих препаратах
визначають відсотковий розподіл ядер з різним
ступенем політенії хромосом (СПХ), що розрізня-
ють за шириною хромосом та інтенсивністю забар-

(13) U

(11) 52573

(19) UA

рвлення ацетоорсеїном, після чого розраховують середні значення СПХ і за різницею між середніми значеннями СПХ у досліді та контролі судять про активність БАР.

При вирощуванні личинок дрозофіли в умовах додавання у живильне середовище БАР з певними концентраціями відбуваються зміни рівня ендоре-дуплікації гігантських хромосом у клітинах личинок-ових тканин, зокрема, в слинних залозах, що проявляється у зміні їхнього ступеня політенії. В свою чергу СПХ характеризує рівень помноження геному у клітинному ядрі та є механізмом регулювання експресії генів і одним з показників інтенсивності метаболізму. Про активність БАР судять за зміною середнього значення СПХ, яке розраховують за даними про відсоткове співвідношення ядер з різним СПХ, використовуючи цитоморфометричний метод [5].

Технічним результатом корисної моделі є досягнення високої інформативності запропонованого способу, що заснований на одному з базових цитогенетичних показників, а також можливість визначення оптимальних концентрацій окремих БАР та оцінки їхньої сумісної дії в умовах *in vivo*. Достовірність способу - 95%.

Спосіб здійснюють таким чином.

Спочатку готують живильне середовище з додаванням БАР у заданих (дослід) та нульовою (контроль) концентраціях. На приготованому живильному середовищі, у якості індикаторного організму, вирощують личинок дрозофіли. Наприкінці 3-ї стадії розвитку у личинок виділяють слинні залози та готують давлені ацетоорсеїнові препарати політенних хромосом, на яких досліджують СПХ. Наприкінці 3-ї личинкової стадії в слинних залозах

Drosophila melanogaster виявляються гігантські хромосоми зі ступенями політенії 256С, 512С, 1024С і 2048С (С - число елементарних хромосом). На цитологічних препаратах ці класи ядер характеризуються різною шириною хромосом. У районі диску 22А хромосоми 2L, що приблизно відповідає середній ширині хромосом, їхні поперечні розміри складають, відповідно, 1,6мкм, 2,3мкм, 3,2мкм і 4,6мкм. Чим більший ступінь політенії хромосом, тим інтенсивніше вони забарвлюються ацетоорсеїном. Спочатку визначають відсоткове співвідношення ядер з різним СПХ, після чого розраховують середнє значення СПХ для кожного варіанту дослід. Про активність БАР судять, виходячи з порівняння дослідних даних з контролем.

За одержаними результатами досліджують активність БАР, порівнюють дію різних концентрацій БАР, сумісну дію двох чи декількох БАР, визначають оптимальну концентрацію БАР.

Приклади використання способу, що заявляється.

Приклад 1.

Метою дослідження було визначити за допомогою запропонованого способу дію вітаміну В₁₂ у різних концентраціях, що є нейростимулятором і застосовується, зокрема, у бджільництві. Личинки *D. melanogaster* розвивалися у стандартному цукрово-дріжджовому середовищі з додаванням препарату вітаміну В₁₂ у концентраціях 0,01мкг/мл, 0,10мкг/мл та 1,00мкг/мл. Наприкінці 3-ї стадії у личинок виділяли слинні залози, готували давлені ацетоорсеїнові препарати, на яких визначали СПХ. Отримані дані про вплив вітаміну В₁₂ на ступінь політенії хромосом в слинних залозах личинок дрозофіли приведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Стать	Середні значення СПХ, С			
	Контроль	при концентрації вітаміну В ₁₂ , мкг/мл		
		0,01	0,10	1,00
♀	990,4±16,8	1036,0±20,9	1049,3±20,9	1052,9±10,4
♂	963,9±21,5	1000,5±18,0	1034,9±16,6	1018,4±12,5

Усього у даному експерименті було досліджено по 10-15 личинок у кожному з варіантів дослід.

Таким чином, показана стимулююча дія вітаміну В₁₂ в усіх досліджених концентраціях, оптимально виявилася концентрація 0,10мкг/мл.

Приклад 2.

Метою дослідження було визначити за допомогою запропонованого способу дію гормону ек-

дистерону у різних концентраціях, що регулює линьки та метаморфоз комах. Застосовували концентрації гормону 0,001мкг/мл, 0,010мкг/мл, 0,100мкг/мл та 1,000мкг/мл. Отримані дані про вплив екдистерону на ступінь політенії хромосом в слинних залозах личинок дрозофіли приведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Стать	Середні значення СПХ, С				
	Контроль	при концентрації екдистерону, мкг/мл			
		0,001	0,010	0,100	1,000
♀	810,7±12,3	836,2±9,5	903,3±15,3	876,5±14,3	672,6±28,2
♂	773,9±17,3	724,8±21,8	862,4±12,2	800,2±17,4	690,6±22,6

Виявлено достовірне підвищення СПХ на 10,3% як у чоловічої, так і жіночої статі при концентрації екдистерону 0,010мкг/мл, а також збіль-

шення цього показника на 7,5% при концентрації гормону 0,100мкг/мл у самок у порівнянні з контролем. При концентрації екдистерону 1,000мкг/мл

спостерігали зниження середніх значень СПХ на 10,7% у самок і на 17,0% у самців. Таким чином, було встановлено як стимулюючу (0,010мкг/мл), так і пригнічуючу (1,000мкг/мл) концентрації препарату.

Приклад 3.

Метою дослідження було визначити за допомогою запропонованого способу сумісну дію ектистерону та вітаміну В₁₂ у складі препарату ВЕСБ

(вітамінний, ектистеронний стимулятор бджіл) [1]. Гормон і вітамін входять до складу препарату в рівних концентраціях. Досліджували дію препарату з концентраціями його компонентів 0,001мкг/мл, 0,010мкг/мл, 0,100мкг/мл та 1,000мкг/мл. Отримані дані про вплив препарату ВЕСБ, що містить ектистерон і вітамін В₁₂, на ступінь політенії хромосом в слинних залозах личинок *Drosophila melanogaster* приведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Стать	Середні значення СПХ, С				
	Контроль	при концентрації ектистерону та вітаміну В ₁₂ , мкг/мл			
		0,001	0,010	0,100	1,000
♀	864,1±20,8	886,0±30,8	936,3±31,2	844,5±34,8	776,2±25,2
♂	851,2±28,4	851,3±20,9	893,7±14,0	814,1±33,5	761,3±27,4

Отримані результати свідчать про те, що стимулююча дія препарату ВЕСБ, який містить ектистерон і вітамін В₁₂, проявляється при концентрації компонентів 0,010мкг/мл; а при концентрації 1,000мкг/мл має місце пригнічуюча дія препарату.

Джерела інформації:

1. Какпаков В.Т. Патент RU №2034504, А23К 1/18, опубл. 10.05.1995.

2. Ян де Вильде. Гормональная борьба с насекомыми // Наука и человечество. - М.: Знание. - 1976. - С.147-153.

3. Шеховцова Т.Н. Биологические методы анализа // Соросовский Образовательный Журнал. - 2000. - №11. - С.17-21.

4. Какпаков В.Т., Шамшурин А.А., Спектор В.И., Мунтян Г.Е. Подавление роста длительно пересеваемых линий эмбриональных клеток дрозофилы под действием гормонов насекомых и циклического АМФ // Физиология и биохимия животных. - 1974. - №3. - С.67-71.

5. Страшнюк В.Ю., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом // Генетика. - 1995.- Т.31, №1. - С.24-29.