

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛИКОГЕНА В ГЕЛЬМИНТАХ: ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА АММОНИЯ В РАЗНОМ ТЕМПЕРАТУРНОМ ДИАПАЗОНЕ

Сидор Е. А.¹,

аспирант лаборатории паразитарных зоонозов,
evgenia.sidor@gmail.com

Аннотация

Спектрофотометрические методы определения содержания гликогена применяются в исследованиях для количественной оценки действия антигельминтных препаратов на углеводный и энергетический метаболизм гельминтов. К наиболее специфичным из них относится предложенный Krisman С.Р. метод, который позже был адаптирован Данченко Е.О. и Чиркиным А.А. для применения в области судебно-медицинской экспертизы, а Андреевым О.Н. с соавт. — в области гельминтологии. В методике используются насыщенные растворы хлорида кальция и аммония. Известно, что растворимость солей зависит от температуры. Krisman С.Р. изучила влияние хлорида кальция на оптическую плотность анализируемых растворов в зависимости от температур, однако детальных исследований роли хлорида аммония произведено не было. В настоящей работе представлены данные о влиянии хлорида аммония на оптическую плотность анализируемых проб под воздействием температур в диапазоне 10–30 °С. Данная соль, вводимая для нейтрализации щёлочи, способствует увеличению оптической плотности исследуемых растворов. Установлено, что хлорид аммония не только нивелирует снижение оптической плотности, но и вызывает её повышение с ростом температур. В пробах, не содержащих соль, отклонение от заданного содержания гликогена (0,1 мг) в интервале 10 °С составляло 12,1%, а при добавлении хлорида аммония — уменьшалось и колебалось в пределах 4–8,5%. Для повышения точности анализа рекомендуется избегать проведения исследований в больших диапазонах температур.

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

Ключевые слова: гликоген, антигельминтики, спектрофотометрический метод, энергетический метаболизм гельминтов.

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINING GLYCOGEN CONCENTRATION IN HELMINTHS: INFLUENCE OF AMMONIUM CHLORIDE IN DIFFERENT TEMPERATURE RANGE

Sidor E. A. ¹,

Postgraduate Student of the Laboratory of Parasitic Zoonoses,
evgenia.sidor@gmail.com

Abstract

Spectrophotometric methods for determining glycogen content are used in studies to quantify the effect of anthelmintics on carbohydrate and energy metabolism of helminths. The most specific of them include the method proposed by Krisman C.R., which was later adapted by Danchenko E.O. and Chirkin A.A. to apply in forensic medicine, and Andreyanov O.N. et al. in helminthology. Saturated solutions of calcium chloride and ammonium chloride are used in the procedure. It is known that the solubility of salts depends on temperature. Krisman C.R. studied the effect of calcium chloride on the optical density of the analyzed solutions depending on temperatures, but no detailed studies were made on the role of ammonium chloride. The present paper presents data on the effect of ammonium chloride on the optical density of the analyzed samples under the influence of temperatures in the range of 10–30 °C. This salt introduced to neutralize alkali increases the optical density of the solutions. It is found that ammonium chloride not only neutralizes the decrease in optical density, but also causes its increase as temperatures increase. In salt-free samples, the deviation from the specified glycogen content (0.1 mg) in the range of 10 °C was 12.1%, and with the addition of ammonium chloride, it decreased and varied within 4–8.5%. To improve the accuracy of the analysis, it is recommended to avoid studies in large temperature ranges.

Keywords: glycogen, anthelmintics, spectrophotometric method, energy metabolism of helminths.

¹ All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

Введение. Поиск эффективных антигельминтных средств и выяснение механизма их действия сопровождается исследованиями содержания и депонирования гликогена для определения влияния препаратов на углеводный и энергетический метаболизм гельминтов, как основу их жизнедеятельности [3, 5, 6]. Для количественного определения содержания гликогена применяются спектрофотометрические методы. Традиционные методы, основанные на преципитации гликогена этиловым спиртом, гидролизе и измерении концентрации свободной глюкозы нельзя назвать специфическими, поскольку полученные результаты отражают суммарное содержание углеводов в исследуемых образцах, включая свободную глюкозу и другие редуцирующие сахара. Качественная реакция гликогена с йодом, результатом которой является изменение цвета на коричневый, легла в основу спектрофотометрических методов, основанных на определении концентрации непосредственно молекул гликогена. Для повышения чувствительности метода Krisman С. R. (1962) предложила использовать насыщенные растворы хлорида кальция и хлорида аммония [4]. Введение хлорида кальция также снижало влияние температуры на оптическую плотность растворов с 37% до 11% в интервале 10 °С, а введение хлорида аммония уменьшало рН среды (при рН>7,0 образуется гипойодид, и оптическая плотность растворов снижается). Данченко Е. О. и Чиркин А. А. апробировали и адаптировали предложенный Krisman С. R. метод для применения в области судебно-медицинской экспертизы [2], а Андреянов О. Н. с соавт. — в области гельминтологии [1]. Однако, влияние хлорида аммония на оптическую плотность растворов под воздействием различных температур изучено не было.

Материалы и методы. Изучение влияния хлорида аммония на оптическую плотность растворов проводилось в следующих температурных режимах: 10, 15, 20, 25, 30 °С. Используемые и анализируемые растворы доводились до необходимых температур на водяной бане.

Определение содержания гликогена в пробах проводили согласно описанному в патенте способу [1]. Оптическую плотность анализируемых растворов, содержащих 0,1 мг гликогена, измеряли на микроколориметре медицинском фотоэлектрическом МКМФ-02 в кювете с длиной оптического пути 5 мм при длине волны 425 нм против холстой пробы. Градуировочный график строили в пакете программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

Результаты исследований. В анализируемых пробах без хлорида аммония оптическая плотность при повышении температур снижалась, а

в присутствии данной соли, наоборот, увеличивалась, но не так значительно (табл. 1). При расчёте содержания гликогена установлено, что наибольшие отклонения от заданной концентрации, составляющей 0,1 мг в пробе, происходят при 25–30 °С. Вероятно, это связано с увеличением растворимости хлорида аммония и хлорида кальция с ростом температуры.

Таблица 1

**Результаты измерения оптической плотности и расчёта
опытного содержания гликогена в анализируемых растворах
с заданным содержанием гликогена (0,1 мг)**

Хлорид аммония	Температура, °С				
	10	15	20	25	30
Оптическая плотность					
-	0,235	0,216	0,208	0,189	0,182
+	0,230	0,233	0,240	0,251	0,262
Содержание гликогена, мг					
-	0,102	0,094	0,090	0,082	0,079
+	0,100	0,101	0,104	0,109	0,114

Полученные данные о влиянии температуры на оптическую плотность растворов без хлорида аммония оказались схожи с результатами Krisman S.R.: в интервале 10 °С среднее отклонение оптической плотности достигало 12,1% (табл. 2). В присутствии соли отклонение уменьшалось и колебалось в пределах 4–8,5%.

Таблица 2

**Отклонение показателя оптической плотности анализируемых растворов
в зависимости от интервала температур, выраженное в %**

Хлорид аммония	Температурный интервал, °С			Среднее значение
	10–20	15–25	20–30	
-	11,3	12,5	12,5	12,1
+	4,0	7,0	8,5	6,5

Заключение. Добавление хлорида аммония снижает влияние температур на оптическую плотность растворов при определении концентрации гликогена специфическим спектрофотометрическим методом. Для повышения точности анализа рекомендуется избегать проведения исследований в больших диапазонах температур.

Литература

1. *Андреянов О.Н., Сидор Е.А., Тимофеева О.Г.* Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала: пат. 2681167 РФ № 2018106639; опубл. 04.03.2019, Бюл. № 7.
2. *Данченко Е.О., Чиркин А.А.* Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов // Судебно-медицинская экспертиза. 2010. Т. 3. С. 25-28.
3. *Сидор Е.А., Халиков С.С., Архипов И.А., Мусаев М.Б.* Влияние антигельминтиков группы бензимидазолов на содержание гликогена в преимагинальных трематодах *Fasciola hepatica* // Ветеринарная патология. 2020. №. 4. С. 17-22.
4. *Krisman C.R.* A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine // *Analytical biochemistry*. 1962. V. 4. № 1. P. 17-23.
5. *McCracken R.O., Lipkowitz K.B.* Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy // *The Journal of parasitology*. 1990. V. 76. № 6. P. 853-864.
6. *Preet S., Tomar R.S.* Anthelmintic effect of biofabricated silver nanoparticles using *Ziziphus jujuba* leaf extract on nutritional status of *Haemonchus contortus* // *Small Ruminant Research*. 2017. V. 154. P. 45-51.

References

1. *Andreyanov O.N., Sidor E.A., Timofeeva O.G.* A method for determining the amount of glycogen in Trichinella larvae to control the quality of invasive material decontamination: Patent 2681167 RF No. 2018106639; published 03/04/2019, Bulletin No. 7. (In Russ.)
2. *Danchenko E.O., Chirkin A.A.* A new methodological approach to determining glycogen concentration in tissues and some comments on the interpretation of results. *Forensic medical examination*. 2010; 3: 25-28. (In Russ.)
3. *Sidor E.A., Khalikov S.S., Arkhipov I.A., Musaev M.B.* Effect of anthelmintics of the benzimidazole group on glycogen content in preimaginal trematodes *Fasciola hepatica*. *Veterinary pathology*. 2020; 4: 17-22. (In Russ.)
4. *Krisman C.R.* A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical biochemistry*. 1962; 4(1): 17-23.
5. *McCracken R.O., Lipkowitz K.B.* Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. *The Journal of parasitology*. 1990; 76(6): 853-864.
6. *Preet S., Tomar R.S.* Anthelmintic effect of biofabricated silver nanoparticles using *Ziziphus jujuba* leaf extract on nutritional status of *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*. 2017; 154: 45-51.