

За вказаною методикою можна визначити гіалуронідазну активність сперміїв у свіжорозбавленій і заморожено-відтаяній спермі бугаїв.

ЛІТЕРАТУРА

А. Я. Дьячкова, Н. Н. Березовская. Определение активности в сыворотке крови — «Лабораторное дело», 1973, № 6.

Н. Т. Плишко, Р. Н. Меркурьева. Исследование свойств препарата гиалуронидазы, выделенной из полового аппарата самок. — «Бюллетень экспериментальной биологии», 1974, № 11.

М. Н. Приваленко, Н. В. Виха. — Определение активности гиалуронидазы (гиалуронатглицангидролазы). — «Лабораторное дело», 1974, № 9.

И. И. Соколовская. Гиалуронидаза сохраненного семени. — В кн.: Новое в биологии размножения сельскохозяйственных животных. М., Сельхозгиз, 1951.

Фоулкес, Ватсон. Гиалуронидазная активность семенной плазмы как метод определения целостности живчиков быка. — «Животноводство и ветеринария», 1975, № 11.

ДО МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ОКИСЛЮВАЛЬНИХ ФЕРМЕНТІВ У СПЕРМІ БУГАЇВ

Б. М. ЧУХРИЙ, кандидат біологічних наук

Л. О. КЛЕВЕЦЬ, старший лаборант

Науково-дослідний інститут землеробства
і тваринництва західних районів УРСР

Ступінь активності окремих ферментів сперми впливає не тільки на інтенсивність біохімічних перетворень у ній, а й на життєвість статевих клітин та їх запліднювальну здатність (Ю. Максимов, 1960; В. Г. Семаков, 1961, 1964; М. П. Шергін, 1967; П. Майер, М. Михайлов, 1972).

Серед великої кількості ферментів у спермі важливе місце займають дегідрогенази і цитохромоксидаза, які беруть участь у гліколізі статевих клітин і окислювально-відновних процесах.

Існуючі методи визначення активності дегідрогеназ у спермі ґрунтуються в основному на використанні розчинів метиленової синьки (М. П. Шергін, 1940; Є. А. Мамзіна, В. В. Комарова, 1968) і 2, 3, 5-трифенілтетразолію (В. Г. Семаков, 1961, 1964; А. Г. Хавінзон, 1966, 1967; Є. М. Бітюков, В. М. Прокопцев, 1969; В. М. Прокопцев, А. Рустенов, 1971; В. М. Прокопцев, Є. М. Бітюков, А. Рустенов, 1973). При цьому активність ферменту визначають за часом відновлення метиленової синьки або випадання червоного осаду формазану в досліджуваній пробі.

Для визначення цитохромоксидазної активності використовують реактив «наді», який в присутності ферменту забарвлюється у фіолетовий колір. За часом появи забарвлення судять про активність цитохромоксидази (В. Г. Семаков, 1961, 1964; Йосифов, 1966;

А. Г. Хавінзон, 1966, 1967; В. М. Прокопцев, Є. М. Бітюков, А. Рус-
тенов, 1973).

Згадані методи не позбавлені суб'єктивності, а що стосується дегідрогенази, то вони зводяться до визначення сумарної активності ферменту. Тому метою наших досліджень була розробка об'єктивних колориметричних методів визначення активності лактатдегідрогенази, сукциндегідрогенази і цитохромоксидази в спермі бугаїв з використанням пірвіноградної кислоти і сукцинату натрію як субстратів.

При визначенні активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) використовували дещо змінену методику Вроблевського (1955). Активність ферменту визначали колориметрично за концентрацією динітрофенілгідразонпірувату, яка залежить від кількості залишеної пірвіноградної кислоти в пробі сперми після інкубування її з відновленим нікотинамідаденіндинуклеотидом (НАДН₂). За одиницю активності брали 1 *мкг* перетвореної пірвіноградної кислоти 1 *мл* сперми.

Активність ферменту визначали в нерозбавленій і розбавленій спермі. Для роботи готували: 1) субстратний розчин—1 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ розчиняли в 100 *мл* дистильованої води і додавали 0,02 *мл* пірвіноградної кислоти; 2) НАДН₂-субстратний розчин — 10 г НАДН₂ розчиняли в 10 *мл* субстратного розчину (розчин нестійкий, тому готували його перед використанням); 3) розчин 2,4-динітрофенілгідразину — 200 *мг* 2,4-динітрофенілгідразину розчиняли протягом 1 *хв* у киплячій водяній бані в 85 *мл* концентрованої НСІ з доведенням до 1 *л* дистильованою водою; 4) 0,4 *н.* розчин NaOH.

Для визначення активності ферменту в нерозбавленій спермі готували дослідну і контрольну проби. В пробірку з дослідною пробою вносили 0,02 *мл* сперми і 0,2 *мл* НАДН₂-субстратного розчину, в контрольну — лише 0,2 *мл* субстратного розчину. Обидві проби інкубували 45 *хв* при 38°. Після інкубації доливали по 0,5 *мл* розчину 2,4-динітрофенілгідразину, а в пробірку за контрольною пробою, крім того, вносили 0,02 *мл* досліджуваної сперми. Через 20 *хв* до контрольної і дослідної проб додавали по 5 *мл* розчину NaOH, фільтрували й через 30 *хв* (рахуючи від часу доливання луку) фільтрат колориметрували на фотоелектроколориметрі при синьому світлофільтрі, використовуючи кювети з товщиною робочого шару 3 *мм*, а як компенсаційну рідину — воду. Визначивши різницю за показниками екстинкцій між контрольною і дослідною пробами ($E_x - E_d$), знаходили кількість перетвореної пірвіноградної кислоти, виражену в одиницях екстинкції. Потім за допомогою стандартної кривої, каліброваної розчином пірвіноградної кислоти, різницю $E_k - E_x$ перетворювали в мікрограми і перераховували на 1 *мл* нерозбавленої сперми.

Лактатдегідрогеназну активність розбавленої сперми визначали так, як і нерозбавленої, за винятком того, що в дослідну пробу вносили 0,1 *мл* сперми, розбавленої у співвідношенні 1 : 4, а в контрольну — відповідну кількість розріджувача.

Для визначення активності сукциндегідрогенази модифікували методику В. Г. Семакова (1961), при цьому використали властивість водонерозчинного червоного формазану розчинитися в ацетоні, що дає змогу встановити його кількість.

Для роботи використовували сперму бугаїв, розбавлену 1:4 лактозно-жовтковим середовищем, оскільки в нерозбавленій спермі реакція перетворення сукцинату натрію на фумарат, яку каталізує сукциндегідрогеназа, відбувається дуже повільно і потребує великої кількості сперми.

Суміш, що містить 0,5 мл розбавленої сперми, 0,5 мл 0,2-процентного розчину 2, 3, 5-трифенілтетразолію на фосфатному буфері (рН 7,4) і 0,5 мл 0,2 М розчину янтарнокислого натрію, інкубували протягом 2 год при температурі 38°. Паралельно з дослідними ставили контрольну пробу, в якій інкубували 0,4 мл розріджувача з відповідними реактивами. Після інкубації до кожної проби додавали по 3 мл ацетону, розчин енергійно струшували до повного розчинення червоного осаду, фільтрували і фільтрат колориметрували.

Різницю між екстинкцією дослідної проби і контрольної множили на 100 і одержану величину умовно приймали за активність сукциндегідрогенази в спермі, виражаючи таким чином активність ферменту в одиницях екстинкції.

Для дослідження цитохромоксидазної активності сперми бугаїв користувалися реактивом «наді» (розбавлена в 10 разів дистильованою водою суміш рівних об'ємів 1-процентного розчину α -нафтолу в 50-процентному етиловому спирті, 0,75-процентного розчину парафенілдіаміну солянокислого і 1,7-процентного розчину вуглекислого натрію). Активність ферменту визначали в спермі, розбавленій лактозно-жовтковим середовищем у співвідношенні 1:4. У пробірку вносили 0,5 мл розбавленої сперми і 2,5 мл реактиву «наді». Суміш інкубували протягом 1 год при температурі 38°. З метою врахування оптичної густини розріджувача, а також кількості індофенолового синього, який утворюється в результаті окислення реактиву «наді» киснем повітря, паралельно ставили контрольну пробу з вмістом 2,5 мл реактиву «наді» і 0,4 мл розріджувача без сперми. Після інкубації для екстрагування утвореного індофенолового синього в проби додавали по 5 мл ацетону, фільтрували і фільтрат колориметрували на фотоелектроколориметрі при зеленому світлофільтрі (кювети 3 мм, компенсаційною рідиною була вода).

Визначену різницю екстинкції між дослідною і контрольною пробами множили на 100 і встановлювали активність ферменту в умовних одиницях екстинкції.

Таким чином, за вказаними методами активність лактатдегідрогенази у перерахунку на 1 мл сперми становила $690 \pm 16,2$ одиниць при коливаннях у межах 300—1200 одиниць, активність сукциндегідрогенази — $25 \pm 1,83$ одиниці при коливаннях від 10 до 110 одиниць і цитохромоксидази — $42,6 \pm 2,38$ одиниці (зміна у межах 10—140 одиниць).

ЛІТЕРАТУРА

Битюков Е. Н., Прокопцев В. М. О связи сульфгидрильных групп спермы хряков с некоторыми показателями ее качества.— Материалы I конференции молодых ученых по генетике и разведению сельскохозяйственных животных, т. 11. Л., 1969.

Майер П., Михайлов Н. Оценка спермы по дегидрогеназной активности.— «Свиноводство», 1972, № 7.

Максимов Ю. Новый способ оценки и дозировки семени быка.— «Молочное и мясное скотоводство», 1960, № 4.

Мамзина Е. А., Комарова В. В. Энергетические процессы в семени птиц.— В сб.: Биологические основы размножения и искусственного осеменения сельскохозяйственных животных. Пушкин, 1968.

Прокопцев В. М., Рустенов А. Влияние монодоуксусной кислоты и хлормеркурибензола на дегидрогеназную активность и переживаемость спермы хряков.— Материалы II конференции молодых ученых по генетике и разведению сельскохозяйственных животных. Л., 1971.

Прокопцев В. М., Битюков Е. Н., Рустенов А. Определение активности дегидрогеназ и цитохромоксидазы в сперме хряков.— В сб.: Биохимические методы исследования спермы сельскохозяйственных животных. Пушкин, 1973.

Семаков В. Г. Влияние дегидрогеназной и цитохромоксидазной ферментных систем на жизнедеятельность сперматозоидов.— «Биохимия», 1961, т. 26, вып. 4.

Семаков В. Г. Некоторые из окислительно-восстановительных ферментов семени быка.— Доклады советских ученых к V Международному конгрессу по биологии воспроизведения и искусственному осеменению животных. М., 1964.

Хавинзон А. Г. Активность дегидрогеназной и цитохромоксидазной ферментных систем и содержание глутатиона в сперме сельскохозяйственных животных.— Материалы IV Всесоюзной конференции по физиологическим и биохимическим основам повышения продуктивности сельскохозяйственных животных. Львов, 1966.

Хавинзон А. Г. Изменение активности дегидрогеназной и цитохромоксидазной ферментных систем в сперме хряка при хранении.— В сб.: Физиология и биохимия сельскохозяйственных животных, вып. 5. К., «Урожай», 1967.

Шергин Н. П. Дыхание спермы.— В сб.: Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных, т. I. М., 1940.

Шергин Н. П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных. М., «Колос», 1967.

Иосифов Камен. Сравнительно биохимични проучвания на спермата при селскостопанските животни. VIII. Изследване активността на цитохромоксидазата в спермалните клетки на бик, коч и Perez. Ветеринарномед. науки. 1966. № 7.

Wroblewski F., La Due J. S. Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1955, 90, 210.