

ДО МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ГІАЛУРОНІДАЗИ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

Г. С. ЛІСОВЕНКО, кандидат біологічних наук

Український науково-дослідний інститут розведення
і штучного осіменіння великої рогатої худоби

Гіалуронідаза (К. Ф. 3. 2. 1. 35) — один із ферментів акросоми сперміїв. Найбільш раннім показником пошкодження сперміїв є порушення цілісності акросоми. А підвищення активності гіалуронідази в плазмі після заморожування — відтавання свідчить про пошкодження акросомальних мембран і може служити мірою їх цілісності й здатності сперміїв запліднювати яйцеклітини (Фолкес, Ватсон, 1975).

Для з'ясування взаємозв'язку між ферментативною активністю і запліднювальною здатністю сперміїв ми вивчали активність гіалуронідази сперміїв після їх заморожування — відтавання.

Оскільки простої методики визначення гіалуронідазної активності сперміїв ми не мали порівняльне вивчення активності гіалуронідази сперміїв проводили кількома біохімічними методами, які застосовують для здійснення ферментативної активності сироватки крові та інших біологічних матеріалів. За методикою *Mc. Clean* (1943) ми змогли визначити активність гіалуронідази сперміїв, проте ця методика не досконала. За іншими методиками ферментативну активність сперміїв ми не визначили. Тому необхідно дещо удосконалити найбільш придатні методики, щоб використати їх при визначенні активності гіалуронідази сперміїв. На основі методик І. Рейсіг та ін. (1955) і М. Н. Приваленко, І. В. Віха (1974) та деяких наших модифікацій (порушення цілісності акросоми сперміїв, відмивання клітин, молярність буферного розчину, кількість субстрату і дослідного матеріалу) удосконалена методика визначення гіалуронідазної активності сперміїв при наявності їх у пробі 10—15 млн.

Суть методу полягає у визначенні кількості вільного N-ацетилглюкозаміну, який при високій температурі в лужному середовищі утворює проміжну сполуку, що в кислому середовищі вступає в реакцію з *p*-диметиламінобензальдегідом (*p*-ДМАБ) з утворенням забарвленої речовини. Інтенсивність забарвлення є показником активності ферменту.

При використанні цього методу необхідні такі реактиви: 2,8-процентний розчин лимоннокислого натрію, тризаміщеного п'ятиводного; 0,1 М ацетатний буфер з 0,15 М хлористого натрію при рН 3,7; 0,2-процентний розчин гіалуронової кислоти, одержаної із пупкових канатиків новонароджених; 0,8 М розчин тетраборату калію при рН 9,2; 10 н. розчин соляної кислоти; суміш з 10 н. соляної і льодової оцтової (1 : 7) кислот; 10-процентний розчин *p*-диметиламінобензальдегіду на суміші кислот, який можна використовувати протягом місяця, зберігаючи його в холодильнику. Перед використанням цей розчин необхідно розбавити в 10 разів (1 : 9) льодовою оцтовою кислотою.

Точність визначення залежить від ретельності приготування розчинів і дослідного матеріалу та відмивання ферменту, який виділюється в плазму з мертвих статевих клітин. Відомо, що з убитих при заморожуванні сперміїв можна повністю відмити всю гіалуронідазу 1—2 промиваннями (І. І. Соколовська, 1951).

Перед побудовою каліброваної кривої необхідно приготувати стандартний розчин N-ацетилглюкозаміну: 1 мг речовини розчинити в 10 мл бідистильованої води так, щоб в 0,01 мл розчину містилось 1 мкг реактиву, і приготувати відповідні проби (див. таблицю).

Таблиця для побудови каліброваної кривої

Показники	Номери пробірок							
	1	2	3	4	5	6	1 нас-тупні	конт-роль
Кількість стандартного розчину, мл	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	—	—
Кількість бідистильованої води, мл	0,48	0,46	0,44	0,42	0,40	0,38	—	0,50
МКГ N-ацетилглюкозаміну	2	4	6	8	10	12	—	—

Хід визначення гіалуронідазної активності сперміїв. Заморожену сперму розморозити згідно з інструкцією (одну гранулу відтаяти в 1 мл цитрату натрію при +40°).

Проби центрифугувати протягом 20 хв при 6—7 тис. об/хв, рідину обережно злити, осад промити ще раз цитратом при такому ж режимі центрифугування. Центрифугат видалити, до осаду додати 0,3 мл бідистильованої води і залишити на 15—20 хв при кімнатній температурі. Потім додати 0,2 мл 0,1 М розчину ацетатного буферу і 0,2 мл 0,2-процентного розчину гіалуронової кислоти.

Інкубувати при температурі 37° протягом 18 год. Разом з дослідними пробами ставити пробу з реактивами без сперміїв. Після закінчення інкубаційного періоду проби витримати в водяній бані при температурі 100° протягом 10 хв, щоб зсвівся білок, і відокремити його за допомогою центрифугування проб (15—20 хв при 5 тис. об/хв).

До центрифугату додати 0,1 мл 0,8 М розчину тетраборату калію. Проби знову витримати 3 хв у водяній бані при температурі 100°. До охолоджених проб додати по 3 мл 10-процентного розчину *p*-диметиламінобензальдегіду на суміші кислот, перемішати і інкубувати 30—40 хв при температурі +37°. Фіолетове забарвлення свідчить про наявність гіалуронідази в досліджуваному матеріалі. Інтенсивність забарвлення слід визначати за допомогою електрофотоколориметра ФЕК-М (зелений світлофільтр, кювети з робочою відстанню 10 мм). Кількість N-ацетилглюкозаміну (в мікрограмах), утвореного протягом 18 год інкубації, визначають за каліброваною кривою.

За вказаною методикою можна визначити гіалуронідазну активність спермій 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 (гиалуронатгликангидролазы). — «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;