

## ДО ПИТАННЯ ГІАЛУРОНІДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У СТАТЕВОМУ АПАРАТІ САМОК

**М. Т. ПЛІШКО,**

кандидат біологічних наук

*Центральна дослідна станція по штучному  
осіменінню сільськогосподарських тварин*

На підставі власних досліджень, а також даних досліджень інших учених І. І. Соколовською (1951, 1957) створена теорія про перший етап запліднення. Суть її полягає в тому, що велика кількість сперміїв атакує яйцеклітину і під впливом звільненого ними ферменту гіалуронідази клітини променистого вінця і оточуючі його фолікулярні клітини розсмоктуються.

Однак є дані, які суперечать цій теорії. Так, за даними Б. П. Хвара (1950, 1954), у яйцепроводі ссавців надходить не так багато спермів, як відмічається в загальноприйнятих описах процесів запліднення. Ці дані висновками узгоджуються дані І. Г. Піткянен і М. Ф. Іванкова (1956).

За повідомленням І. Г. Піткянен (1955, 1956, 1957), у свиней, коли овець розсмоктування фолікулярних клітин проходить через 1—2 год після овуляції навіть у неспарованих самок.

У дослідженнях на свинях (1958—1961 рр.), проведених нами під керівництвом академіка О. В. Квасницького, відмічено, що після овуляції променистий вінець навколо яйцеклітини був відсутній, хоч самок спаровували. Фізіологічними дослідженнями також встановлено, що після введення в яйцепровід 2—54 тис. сперміїв відбувалось запліднення яйцеклітин. Крім того, незважаючи на малу кількість введених сперміїв, запліднені й незапліднені яйцеклітини були без променистого вінця.

У зв'язку з суперечливістю даних щодо цього питання, є потреба у вивченні, чи не виділяється гіалуронідаза в яйцепроводах і матці на різних фазах статевого циклу? Тому ми вивчали деполімеризуючу активність змивів, екстрактів і виділених препаратів з цих відділів статевого апарата, використовуючи фізико-хімічні, біохімічні (Рейссіг і співробітники, 1955) та біологічні методи дослідження.

На основі фізико-хімічних методів дослідження (віскозиметрія, муновий тест за Мак-Кліном—Смирновою) встановили, що в змивах яйцепроводів і рогів матки (свині, корови, кролиці) є фермент, який розщеплює гіалуронову кислоту. Найбільша активність ферменту (30—60 одиниць) відмічається в період проєструсу, еструсу і метеструсу, а в період дієструсу вона різко знижується (12—1 умовна одиниця) і зовсім не проявляється.

Вивчення властивостей ферменту в змивах і екстрактах показало,



що гепарин (0,44 мл—1,3 мг) і трипсин (0,4—0,6 мг на інкубаційну суміш) повністю інгібують його активність; 5—10-хвилинне кип'ятіння інактивує цей фермент.

Є дані про те, що гепарин і трипсин гальмує впливають на гіалуронідазу (Х. С. Коштованц, Г. Ф. Белов, 1956; І. І. Соколовська, 1957).

Після виявлення в статевих шляхах самки гіалуронідази ми одержували її у вигляді препарату. Для цього застосували методику, яка використовується для одержання лідази. Ліофільне висушування проводили на Київському заводі медичних препаратів. Після ліофільного висушування препарат гіалуронідази (утеролідаза) являє собою білу або блідо-жовту пористу масу, яка легко розчиняється у воді, фізіологічному розчині NaCl та 5—6-процентному розчині глюкози.

Гіалуронідазну активність у такому препараті перевіряли після розчинення вмісту флакона в дистильованій воді або в фізіологічному розчині.

Одержаний з матки препарат порівнювали з угорською (Reanal) ліофілізованою гіалуронідазою сім'яника бугая (серія 6611909), активність якої виражається в одиницях УШП і становить не менше 300 од/мг.

При дослідженні 0,01-процентного розчину гіалуронідази сім'яників бугаїв (виробництво Reanal) сильна дія відмічалась у титрі 1:64 і дещо слабша — 1:128. Активність виділеної нами утеролідази проявлялась приблизно при такому ж титрі (1:32—1:128); такі коливання залежали від періоду статевого циклу, коли була взята як сировина матка.

Біологічні тести (за Дюран-Рейналсом) ставили на кроликах, враховуючи внутрішньошкірну реакцію за дифузією індикатора. Через 5 хв і через 20 год після введення внутрішньошкірно досліджуваного препарату з 2-процентним розчином трипанової сині (0,25 мл у

1. Активність препаратів гіалуронідази матки свиней і сім'яників бугаїв (біологічні дослідження)

Введені в шкіру речовини	Дифузія фарби в шкірі кролика		Індекс дифузії (Клода) через 20 год (M±m)
	протягом 5 хв см <sup>2</sup>	протягом 20 год см <sup>2</sup>	
Контроль (фізіологічний розчин + 2-процентний розчин трипанової сині в рівних співвідношеннях)	15,7	21,3	1,35±0,05
Гіалуронідаза матки, виділена в період дієструсу + 2-процентний розчин трипанової сині в рівних співвідношеннях	15,1	40,8	2,68±0,17
Гіалуронідаза матки, виділена в період проєструсу, еструсу, метеструсу + 2-процентний розчин трипанової сині у співвідношенні 1:1	19,0	155,9	8,22±0,86
Гіалуронідаза сім'яників бугаїв, 15 одиниць УШП (0,04-процентний розчин) + 2-процентний розчин трипанової сині у співвідношенні 1:1	17,8	96,7	5,43±0,85

івних співвідношеннях) вимірювали площу дифузії фарби. Показник величини площі дифузії в досліді ділили на показник величини площі контролю і визначали індекс дифузії (індекс Клода).

За другою біологічною методикою дослідження проводили так: ввели внутрішньошкірно досліджуваний матеріал, в якому припускалась наявність фактора дифузії, зразу ж робили внутрішньовенно ін'єкцію — 6 мл 1-процентного розчину (2 мл на 1 кг ваги) трипанової сині на фізіологічному розчині. Потім визначали момент появи забарвлення на місці внутрішньошкірного введення досліджуваного матеріалу.

Дослідженнями встановлено, що виділений із слизової оболонки матки препарат утеролідаза в період проєструсу, еструсу і метеструсу має високу активність (табл. 1). Якщо площа плями спочатку становила 19 см<sup>2</sup>, то через 20 год вона збільшилась у середньому в 8 раз, а в контролі вона майже не змінилась.

Гіалуронідазна активність в період дієструсу була значно нижча. В багатьох випадках із слизової матки, взятої від свиней в період дієструсу, препарат одержати не вдалося.

При порівнянні індексу дифузії стандартного препарату (гіалуронідаза сім'яників бугаїв вводилась у відомій концентрації) з індексом дослідного в період проєструсу, еструсу і метеструсу виходить, що таке поширення індикатора може відбутися приблизно при 22 одицях.

Отже, в місцях введення утеролідази, виділеної із слизової матки в період проєструсу, еструсу і метеструсу, а також гіалуронідази сім'яників бугаїв інтенсивне забарвлення зон виникає вже через 10—20 хв після ін'єкції у вену вуха кролика трипанової сині, в той час як на контролі забарвлення зовсім не виникає. У місцях введення препарату, одержаного в період дієструсу, забарвлення через 60—90 хв було дуже слабким.

Біохімічні дослідження проводили після 24—48-годинної інкубації препаратів гіалуронідази при температурі 37—38°. Інкубаційна суміш складалась з рівних співвідношень розчину досліджуваного препарату, цитратного буфера рН 4,5 і субстрату (гіалуронова кислота) з додаванням у всі проби двох крапель фізіологічного розчину NaCl. Препарат утеролідазу розчиняли в 1 мл дистильованої води. Стандартний препарат гіалуронідази сім'яників бугаїв розводили з таким розрахунком, щоб концентрація його становила 10 мг/мл (3000 ОД). В контролі замість досліджуваного препарату в інкубаційну суміш вводили дистильовану воду або фізіологічний розчин. Після інкубації суміш фільтрували, і для дослідів брали по 0,5 мл фільтрату.

Під впливом ферменту, виділеного з матки в період статевої активності, гіалуронова кислота розпадалась, і звільнялось в середньому 13,18 мкг N-ацетилглюкозаміну ( $P > 0,001$ , табл. 2). Активність препарату, одержаного в період дієструсу, була дуже низькою.

Розрахунок за наслідками стандартного препарату показав, що у пробі з інкубаційною сумішшю, в якій була утеролідаза, виділена в період проєструсу еструсу і метєструсу, активність дорівнювала в середньому 470 од/мл, а в пробі з препаратом періоду дієструсу — 79 од/мл. N-ацетилглюкозамін виникає при інкубації фолікулярної рідини з виділеним з матки ферментом. До складу фолікулярної рідини входить гіалуронова кислота, яка в даному випадку була субстратом для виділеного ферменту.

Вивчали також (in vitro) вплив виділеного з матки препарату утеролідази на променистий вінець і оточуючі його у великій кількості фолікулярні клітини. З фолікулів перед овуляцією яйцеклітини витягували. У спеціальні чашечки з ямкою наливали по 1 мл розчину дослідного препарату (в контрольну — фізрозчин NaCl) і поміщали по 3 яйцеклітини, взятих з яєчників однієї і тієї ж свині. Інкубацію проводили в термостаті при температурі 38° протягом 6 год. У період інкубації яйцеклітини періодично обережно переміщали (перекочували) за допомогою запаяних пастерівських піпеток. Після закінчення і інкубації в контрольній чашці яйцеклітини істотних змін не мали. Після інкубації в дослідній чашці оточуюча яйцеклітину речовина втратила еластичність, стала дуже крихкою, і при перекочуванні яйцеклітин вона ламалась, при легкому доторкуванні до променистого вінця він у більшості випадків відпадав. Можна припустити, що подібну механічну функцію in vivo виконують ворсинки епітелію та стінка яйцепроводу в процесі його скорочення.

Таким чином, фермент, що виділяється в яйцепроводах і матці, може звільняти яйцеклітину від променистого вінця.

У змивах фімбрії яйцепроводів також виявили гіалуронідазу (особливо висока активність її в період еструсу). Є дані (Діроф, 1932; Б. П. Хватов, 1954), що в момент наступного лопання фолікулів фімбрія труби щільно охоплює зрілий фолікул, і перед овуляцією на поверхні фолікула виникає стоншена ділянка оболонки. Вважають

## 2. Активність препаратів гіалуронідази матки свиней і сім'яників бугаїв

Досліджувані матеріали	Кількість відщепленого N-ацетилглюкозаміну в 0,5 мл інкубаційної суміші, мкг	Активність гіалуронідази в інкубаційній суміші (розрахунок за стандартним препаратом із сім'яників бугаїв), одиниць УШП
Гіалуронідаза сім'яників бугаїв (концентрація в інкубованій суміші 1000 од/мл)	27,79 ± 1,28	1000
Гіалуронідаза матки, виділена в період дієструсу	2,20 ± 0,60	79
Гіалуронідаза матки, виділена в період проєструсу, еструсу і метєструсу	13,18 ± 0,90	470



Б. П. Хватов, 1954; І. Г. Піткянен, 1961), що дозрівання і розрив фолікулів регулюються нервово-рефлекторним впливом. На думку О. В. Кваницького, на овуляцію певною мірою впливають ферменти, які є у фолікулярній рідині. Вони сприяють розрідженню міжклітинної речовини і приводять до ферментативного стоншення стінок фолікула. Не виключено, що так діяти на стінку фолікула фермент може не лише із середини, а й з поверхні в той період, коли фібрія яйцепроводу щільно охоплює дозрілі фолікули яєчника і виділяє гіалуронідазу.

При дослідженні з доктором медичних наук Є. Т. Михайленко яйцепроводів людини ми також виявили фермент гіалуронідазої дії.

На основі досліджень встановили, що в період поросності свиноматок у змиві та екстракті слизової матки є фермент гіалуронідазої дії. Наприклад, на 30—50-й день поросності активність його становила 12—14 умовні одиниці. У даний період поросності цей фермент, очевидно, ідіграє істотну роль у період прикріплення бластоцисти і в обмінних процесах між материнським організмом і зародком.

Слід зазначити, що активність препарату гіалуронідази (0,06—0,15 мг), виділеного з 1 млрд. сперміїв, становить 90—120 умовних одиниць.

Доказом того, що виявлений у яйцепроводах і рогах матки фермент є дійсно ферментом гіалуронідазного типу дії, який секретується певні періоди фізіологічного стану, є відповідні експериментальні дані. Виявлений фермент інактивується при характерній для інактивації ферментів температурі специфічним інгібітором гепарином, а також трипсином; має властивості фактора поширення, тобто сприяє швидкому поширенню внутрішньошкірно індикатора (трипанова синь); понижує в'язкість гіалуронової кислоти; впливає на мукополісахарид, який в'язує фолікулярні клітини, а також на фолікулярну рідину, яка має гіалуронову кислоту, знижує її в'язкість (віскозиметричний метод дослідження) і розщеплює до ацетилглюкозаміну (біохімічна реакція); озщеплює субстрат (гіалуронову кислоту) до ацетилглюкозаміну, аналогічно гіалуронідазі, виділеній із сім'яників і сперміїв; виділяється фермент з промивної рідини і екстрактів яйцепроводів та рогів матки вигляді препарату. Після розчинення такий препарат має ті ж властивості, що й змиви або екстракт.

Непрямим доказом є підвищення гіалуронідазої активності в кінці проєструсу, особливо в яйцепроводах, в період еструсу і метеструсу в рогах матки і яйцепроводах) та згасання активності ферменту в період дієструсу.

Одержані результати, а також літературні дані дають можливість запропонувати нову концепцію процесу запліднення, зокрема на першому його етапі, яка полягає в тому, що звільнення яйцеклітини від роменистого вінця і підготовка до запліднення здійснюються в комплексі з гіалуронідазою, яка виділяється в яйцепроводах.

Гіалуронідаза сперміїв діє локально при проникненні спермія через оболонку яйцеклітини.

Виявлення в яйцепроводах і матці ферменту гіалуронідази дасть можливість по-новому пояснити процеси запліднення, імплантації бластоцисти та обмінні процеси між материнським організмом і зародком, а також по-новому дозувати сперму при штучному осіменінні сільсько-господарських тварин. Воно допоможе з'ясувати деякі невідомі до цього часу причини безплідності самок, пов'язані з порушенням секреції гіалуронідази в статевому апараті, та розробити методи профілактики і лікування цих порушень.

Препарати гіалуронідази знаходять широке застосування в біології та медицині, наприклад, при запальних захворюваннях статевої системи жінок і для лікування безплідності (А. Б. Прейсман, 1960). Препарати гіалуронідази часто використовують разом з різними фармакологічними препаратами, які вводять парентерально для прискорення їх всмоктування і для швидшого досягнення належної їх концентрації в крові (С. Я. Капланський, 1962).

Застосування гіалуронідази разом з фармакологічними препаратами набуло значного поширення для місцевої анестезії (новокаїном та ін.).

Важливе значення має розщеплення гіалуронової кислоти сполучної тканини гіалуронідазою для усунення келоїдних рубців, лікування склеродерми та інших затвердінь, викликаних розвитком сполучної тканини, для кращого загоювання ран і лікування ортопедичних захворювань (Н. М. Пріоров, Б. С. Касавіна, Б. М. Беленькая і М. Ніколаєва, 1956; Б. С. Касавіна і Л. І. Музикант, 1958; Б. С. Касавіна, Г. М. Беленькая і І. Н. Шинкаренко, 1959, та ін.).

Препарати гіалуронідазної дії (лідаза, ронідаза) незалежно від їх технічної назви в основному виготовляють з сім'яників статевозрілої худоби. Для цього потрібна дуже велика кількість сім'яників. У зв'язку з цим можна використовувати слизову матки як джерело гіалуронідази.

Рекомендована сировина є у великій кількості на м'ясокомбінатах і ще не використовується промисловістю.

Попередні розрахунки показали, що з однієї матки (100—250 г слизової) статевозрілої свині можна одержати препарат гіалуронідазної дії з активністю більше 7000 одиниць, тобто приблизно 100 флаконів по 64 одиниці в кожному, а з 1 кг слизової більше 30000 одиниць (500 флаконів), в той час як з 1 кг сім'яників одержують лише 75—100 флаконів лідази по 64 одиниці.