

УДК: 577.151.64:591.463.1.

АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОФОРМ ХОЛІНЕСТЕРАЗ У СПЕРМІ ПЛІДНИКІВ

Н. В. Насєдкіна, Д. Д. Остапів, І. М. Яремчук, С. Б. Корнят
samd@inenbiol.com.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна

Вивчали активність специфічної (ацетилхолінестерази, АХЕ) і неспецифічної (бутирилхолінестерази, нХЕ) холінестераз та ізоформи АХЕ в спермі плідників. Встановлено, що сперма кнура характеризується низькою активністю АХЕ (16,3±1,44 нмоль/хв×мг білка) і нХЕ (6,0±0,94 нмоль/хв×мг білка), барана — високою (відповідно 67,7±3,21 і 25,0±2,05 нмоль/хв×мг білка), а бугая — займає проміжне місце (АХЕ — 48,3±8,72, а нХЕ — 15,7±2,37 нмоль/хв×мг білка). Виявлено, що основна частина активності АХЕ в еякулятах плідників припадає на плазму сперми (59,5–81,6 %), а нХЕ — на спермії у бугая та барана (74,8–93,6 %) і на плазму сперми — у кнура (71,7 %). Для еякулятів бугаїв і баранів характерні 5–6 основних ізоформ АХЕ і 3–4 мінорних, а кнура, відповідно, 3–4 і 2–3. Для еякулятів кнура, як і плазми, а також сперми бугая у кількісному відношенні вміст ізоформ поступово знижується зі збільшенням швидкості міграції протеїнів ензиму в 7,5 % поліакриламідному гелі. На противагу, у плазмі сперми і сперміях бугая майже 1/3 вмісту ізоформ припадає на АХЕ4 (29,3–34,1 %), децю менше (10,3–18,0 %) на АХЕ3, АХЕ5 і АХЕ6 і найменше (1,9–6,6 %) на АХЕ1, АХЕ2 і АХЕ7. Для еякулятів і плазми сперми барана характерний вищий вміст АХЕ4 (30,9–33,1 %), менший АХЕ5 (18,1–25,9) і низький АХЕ7 (6,9–7,5 %). Виявлено, що число і вміст ізоформ АХЕ в спермі зумовлені індивідуальними особливостями, рівнем годівлі та інтенсивністю використання плідників.

Ключові слова: АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗА, НЕСПЕЦИФІЧНА ХОЛІНЕСТЕРАЗА, ІЗОФОРМИ, СПЕРМА, ПЛІДНИКИ

CHOLINEESTERASE ACTIVITY AND ISOFORM CONTENT IN BREEDER SPERM

N. Nasedkina, D. Ostapiv, I. Jaremchuk, S. Kornyat
samd@inenbiol.com.ua

Institute of animal biology NAAS, V. Stusa St., 38; Lviv, 79034, Ukraine

Specific (acetylcholinesterase; AChE) and nonspecific (butyrylcholinesterase; nChE) cholinesterase activity and AChE isoform content in breeder sperm were studied. It is set, that boar sperm characterizes by low activity of AChE (16.3±1.44 nmol/min×mg protein) and nChE (6.0±0.94 nmol/min×mg protein), ram has a high values (67.7±3.21 and 25.0±2.05 nmol/min×mg protein), bull semen indicators occupy an intermediate position (AChE — 48.3±8.72 and nChE — 15.7±2.37 nmol/min×mg protein). It is found, that main part of AChE activity in breeder ejaculates falls on sperm plasma (59.5–81.6 %), and nChE — on bull and ram spermatozoa (74.8–93.6 %) and on sperm plasma — in boar (71.7 %). Bull and ram ejaculates characterizes by 5–6 main AChE isoforms and by 3–4 minor, and boar, correspondingly, 3–4 and 2–3. Quantitatively for boar ejaculates, as in plasma and bull sperm isoform content lowers with the speed migration increase of enzyme proteins in 7.5 % polyacrilamide gel. On the contrary, in bull sperm plasma and spermatozoa almost 1/3 of isoform content is AChE4 (29.3–34.1 %), lesser (10.3–18.0 %) — AChE3, ACE5 and AChE6 and the least is (1.9–6.6 %) AChE1, AChE2 and AChE7. Ram ejaculates and sperm plasma characterizes by higher content of AChE4 (30.9–33.1 %), lesser AChE5 (18.1–25.9) and the least — AChE7 (6.9–7.5 %). It was found that, AChE quantity and isoform content in sperm are caused by individual features, feeding and intensity of breeder usage.

Keywords: ACETYLCHOLINESTERASE, NONSPECIFIC CHOLINESTERASE, ISOFORMS, SPERM, SIRE

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОФОРМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ В СПЕРМЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Н. В. Наседкина, Д. Д. Остапів, И. М. Яремчук, С. Б. Корнят
samd@inenbiol.com.ua

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38; г. Львов, 79034, Украина

Изучали активность специфической (ацетилхолинэстеразы; АХЭ) и неспецифической (бутирилхолинэстеразы; нХЭ) холинэстераз и изоформы АХЭ в сперме производителей. Установлено, что сперма хряка характеризуется низкой активностью АХЭ (16,3±1,44 нмоль/мин×мг белка) и нХЭ (6,0±0,94 нмоль/мин×мг белка), барана — высокой (соответственно, 67,7±3,21 и 25,0±2,05 нмоль/мин×мг белка), а быка — занимает промежуточное положение (АХЭ — 48,3±8,72 и нХЭ — 15,7±2,37 нмоль/мин×мг белка). Выявлено, что основная часть активности АХЭ в эякулятах производителей приходится на плазму спермы (59,5–81,6 %), а нХЭ — на спермии у быка и барана (74,8–93,6 %) и на плазму спермы — у хряка (71,7 %). Для эякулятов быков и баранов характерны 5–6 основных изоформ АХЭ и 3–4 минорных, а хряка, соответственно, 3–4 и 2–3. В эякулятах хряка, как и плазме, а также в сперме быка в количественном отношении содержание изоформ постепенно снижается с увеличением скорости миграции протеинов энзима в 7,5 % полиакриламидном геле. В плазме спермы и спермиях быка почти 1/3 содержания изоформ приходится на АХЭ4 (29,3–34,1 %), меньше (10,3–18,0 %) на АХЭ3, АХЭ5 и АХЭ6 и низкое (1,9–6,6 %) на АХЭ1, АХЭ2 и АХЭ7. Для эякулятов и плазмы спермы барана характерно высшее содержание АХЭ4 (30,9–33,1 %), меньше АХЭ5 (18,1–25,9) и низкое АХЭ7 (6,9–7,5 %). Выявлено, что число и содержание изоформ АХЭ в сперме обусловлено индивидуальными особенностями, уровнем кормления и интенсивностью использования производителей.

Ключевые слова: АЦЭТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА, НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗА, ИЗОФОРМЫ, СПЕРМА, ПРОИЗВОДИТЕЛИ

Існування клітин, і зокрема спермій, забезпечується інтенсивністю використання субстратів, ресинтезом АТФ і балансом окисно-відновних процесів. Доведено, що одним з регуляторних механізмів, які впливають на вказані процеси, є холінергічні. Зокрема, ацетилхолін активує цитохромоксидазу, посилює окисне і субстратне фосфорилування в мітохондріях клітин тканин [1, 2]. Одночасно, активність холінергічних процесів обмежується ензимами — ацетилхолінестеразою (АХЕ; ацетилхолін-ацетилгідролаза; К.Ф. 3.1.1.7), основним субстратом якої є ацетилхолін [3], і неспецифічною холіністеразою (нХЕ; ацилхолін-ацилгідролаза; К.Ф. 3.1.1.8), субстратами окиснення якої є бутирилхолін, ацетилхолін, бензоілхолін, сукцинілхолін та інші ефіри холіну. Вказані ензими виявлені в спермі самців [4–6]. Зокрема, досліджена активність АХЕ і нХЕ в спермі бугаїв, кнурів, баранів і кролів [4, 7]. Доведено, що ацетилхолін і АХЕ регулюють рухливість та стимулюють акросомну реакцію статевих клітин [8].

Поряд з детальними дослідженнями вказаних процесів у клітинах і тканинах організму, на сьогоднішній день не існує однозначної думки про локалізацію ензимів в еякулятах, а стосовно вмісту ізоформ АХЕ у спермі — результати майже відсутні.

Мета роботи — вивчити локалізацію, видові й індивідуальні особливості активності специфічної і неспецифічної холіністераз та ізоформи АХЕ в еякулятах бугаїв, кнурів і баранів.

Матеріали і методи

Дослідження проведені в Інституті біології тварин НААН та Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». У зв'язку з поставленою метою досліджували свіжоотримані еякуляти (n=3) кнурів, бугаїв та баранів. Сперму бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання — дуплетна садка два рази на тиждень, через дві-три доби; баранів — дві садки на тиждень; кнурів — мануальним

методом, одна садка два рази на тиждень. Еякуляти, попередньо оцінені за фізіологічними показниками (об'ємом, концентрацією і кількістю живих сперміїв), розділили на дві частини. Одну з них залишали (цільна сперма), а іншу центрифугували при 4000 об/хв 10 хв. Плазму сперми відбирали піпеткою, а спермії промивали 0,9 % NaCl і знову центрифугували (4000 об/хв 10 хв). Надосадову рідину відбирали, а осад сперміїв ресуспензували в адекватному за об'ємом до відібраної плазми сперми 0,9 % розчину NaCl. У цільній спермі, плазмі і суспензії сперміїв досліджували вміст загального білка (мг/мл) [9, 10], активність АХЕ і нХЕ — за швидкістю гідролізу субстратів — ацетилхоліну і бутирилхоліну відповідно (нмоль/хв×мг протеїну) [11, 12].

Для виявлення ізоформ ХЕ проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Проби для електрофорезу готували наступним чином: сперму кнура, плазму і суспензію сперміїв бугая й барана не розбавляли, а цільну сперму бугая і барана розбавляли 1:3 0,005 М трис-гліциновим буфером (рН 8,5) і додавали 0,05 мл 40 % розчину сахарози. У лунки 3,5 % ПААГ (концентруючого гелю) вносили 0,04 мл проби. Після електрофорезу виявляли ізоформи ХЕ [13]: пластини ПААГ відмивали від електродного буферу 30 хв в 8 мМ Трис-НСІ буфері (рН 7,4) та інкубували 30 хв за температури 37 °С у середовищі, що містило 20 мкг альфа-нафтил ацетату і 50 мкг діазолію синього С у 100 мл 8 мМ трис-НСІ буфера. Внаслідок розщеплення

ензимом альфа-нафтил ацетату і специфічної реакції альфа-нафтолу з діазолієм синім С в зонах локалізації білків холінестерази утворюється нерозчинний комплекс червоно-коричневого кольору. Копії фореграм отримували прямим скануванням ПААГ. Відносний вміст ізоформ (%) вираховували з використанням програмного забезпечення Soft Spectr 1.3. Ізоформи нумерували залежно від швидкості міграції у ПААГ — від найменш до найбільш рухливої. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М.О. Плохінським [14] з використанням програмного забезпечення Clipper. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною з $p < 0,05$ (*) чи $p < 0,01$ (**).

Результати й обговорення

Вміст загального білка в еякулятах кнура низький ($31,7 \pm 3,52$ мг/мл), у бугая вищий на 32,4 % ($p < 0,05$) і найвищий у барана ($58,5 \pm 1,64$ мг/мл; табл. 1). Подібні результати отримані при вивченні вмісту загального білка у сперміях: у кнура величина значення низька ($10,3 \pm 1,06$ мг/мл), у бугая вища на 54,1 % ($p < 0,01$) і найбільша у барана ($38,7 \pm 4,45$ мг/мл), що вище попереднього на 42,1 % ($p < 0,05$) і мінімального на 73,4 % ($p < 0,01$). Відрізнялась величина значення показника і у плазмі сперми: у бугая — вміст білка найвищий ($32,3 \pm 0,82$ мг/мл) і нижчий на 12,1 і 31,6 % ($p < 0,01$), відповідно, у кнура і барана.

Таблиця 1

Вміст загального білка в спермі, мг/мл (n=3, M±m)

Вид тварин	Цільна сперма	Плазма сперми	Спермії
Кнур	$35,0 \pm 3,32$	$28,4 \pm 2,90$	$10,3 \pm 1,06$
Бугай	$51,7 \pm 3,52$	$32,3 \pm 0,82^{**}$	$22,4 \pm 2,52^*$
Баран	$58,5 \pm 1,64$	$22,1 \pm 1,57$	$38,7 \pm 4,45^{**}$

Примітка: різниця статистично вірогідна, порівняно до мінімального значення

Вивченням активності холінестераз встановлено низьку величину АХЕ в спермі кнура ($16,3 \pm 1,44$ нмоль/хв×мг білка), вищу — на 66,3 % у бугая і найвищу у барана ($67,7 \pm 3,21$ нмоль/хв×мг білка; табл. 2).

Аналогічну закономірність виявлено при дослідженні нХЕ: у кнура низька активність ($6,0 \pm 0,94$ нмоль/хв×мг білка), на 61,8 % вища у бугая і максимальна у барана ($25,0 \pm 2,05$ нмоль/хв×мг білка). Отже,

сперма кнура характеризується низькою активністю холінестераз (АХЕ і нХЕ), барана — високою, а бугая — займає проміжне місце. Основна величина активності АХЕ еякулятів проявляється у плазмі сперми, а менша — у сперміях: кнура, відповідно, 81,6 і 18,4 %, у бугая — 69,8 і 38,7 %, барана — 59,5 і 40,3 %.

Одночасно, нХЕ у плазмі сперми кнура становить 71,7 % і сперміях 20,0 %, у бугая, відповідно, 8,2 і 93,6 % та барана — 20,0 і 74,8 %, від загальної активності ензиму в еякулятах. Таким чином, основна частина активності АХЕ локалізована у плазмі сперми плідників, а нХЕ — у сперміях бугая та барана і плазмі сперми кнура.

Таблиця 2

Активність холінестераз, нмоль/хв×мг білка (n=3, M±m)

Вид тварин	Цільна сперма	Плазма сперми		Спермії
		АХЕ		
Кнур	16,3±1,44	13,3±0,98		3,0±0,47
Бугай	48,3±8,72	33,7±5,50		18,7±2,76
Баран	67,7±3,21	40,3±2,68		27,3±0,54
		нХЕ		
Кнур	6,0±0,94	4,3±0,72		1,2±0,15
Бугай	15,7±2,37	1,3±0,27		14,7±2,37
Баран	25,0±2,05	5,0±0,82		18,7±1,91

Аналіз спектру АХЕ в спермі та її компонентах (сперміях і плазмі) свідчить про видові особливості ізоформ ензиму, які характеризуються різною рухливістю в електричному полі, інтенсивністю зафарбування та кількістю смуг активних протеїнів (рис. 1–3). Низькою електрофоретичною рухливістю характеризуються ізоформи АХЕ сперми кнура (рис. 1) і вищою, та майже однаковою, бугая і барана (рис. 2, 3). Візуальним оцінюванням фореграм виявлено, що у спермі кнура і бугая

основна кількість ізоформ ензиму проявляється в плазмі сперми (рис. 1, 2), а у барана — майже однакова — як в плазмі, так і сперміях (рис. 3). При цьому, для еякулятів бугаїв і баранів характерні 5–6 основних ізоформ АХЕ і 3–4 мінорних, а кнура, відповідно, 3–4 і 2–3. При цьому, ізоформи АХЕ у спермі окремих плідників проявляються з неоднаковою інтенсивністю зафарбування та числом протеїнів ензиму, що характеризує індивідуальні особливості самців.

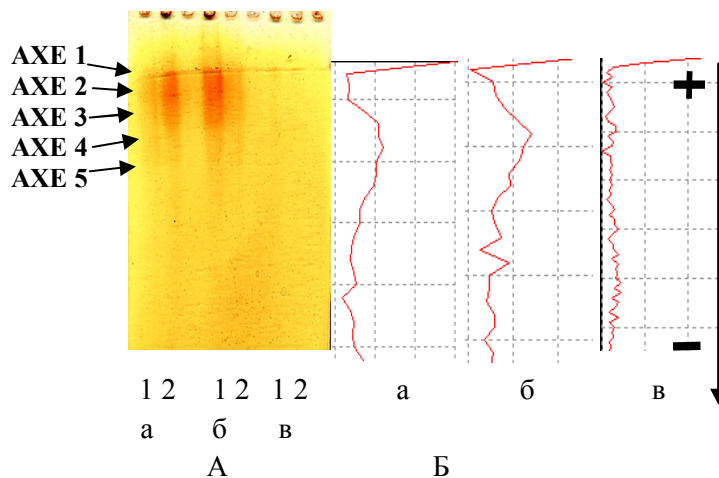


Рис. 1. Ізоформи АХЕ сперми кнура: А — копія фореграм; Б — денситограми: а — цільна сперма; б — плазма; в — спермії; 1, 2 — еякуляти різних кнурів; АХЕ 1–АХЕ 5 — ізоформи ензиму

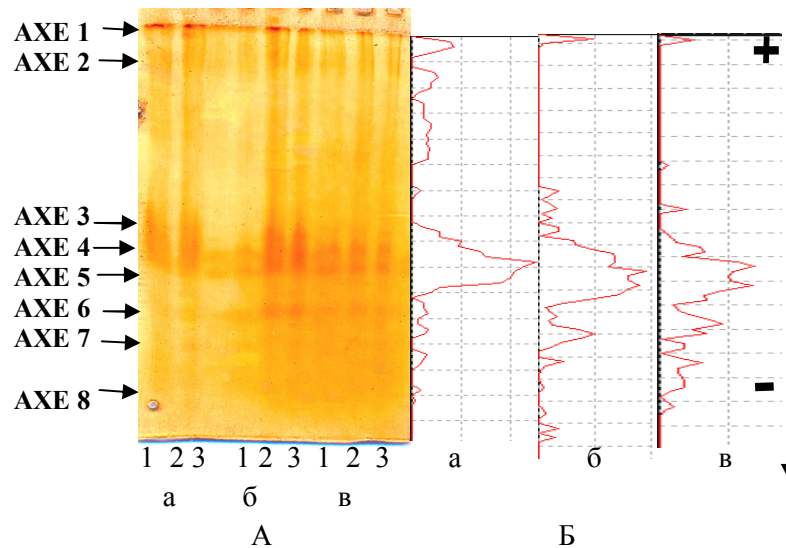


Рис. 2. Ізоформи АХЕ сперми бугая: А — копія фореграм; Б — денситограми: а — цільна сперма; б — плазма; в — спермії; 1-3 еякуляти різних бугаїв; АХЕ 1-АХЕ 8 — ізоформи ензиму

Крім того, за нашими спостереженнями і аналізом роботи племпідприємства «Західплемресурси», мінливість інтенсивності зафарбування і кількість ізоформ АХЕ в еякулятах зумовлена рівнем годівлі та інтенсивністю

використання плідників: понижений рівень забезпечення протеїном раціонів, порушення режиму годівлі й інтенсивне використання плідників призводять до зниження інтенсивності зафарбування і зменшення числа ізоформ АХЕ в еякулятах.

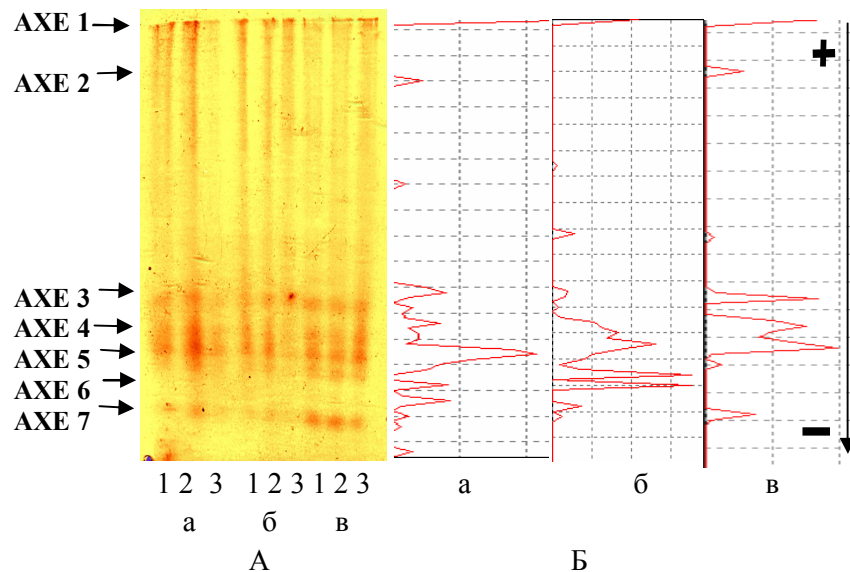


Рис. 3. Ізоформи АХЕ сперми барана: А — копія фореграм; Б — денситограми: а — цільна сперма; б — спермії; в — плазма; 1-3 — еякуляти різних баранів

Аналіз вмісту ізоформ ензиму свідчить, що у спермі всіх самців між концентруючим і розділюючим ПААГ виявляються протеїни з АХЕ-активністю (АХЕ1; рис. 1-3; табл. 3). Їх вміст високий у спермі кнура (30,6±0,95 %) і бугая (27,4±8,44 %) і нижчий у барана (11,4±3,08 %). У спермі кнура вміст ізоформ, із

збільшенням швидкості міграції протеїнів ензиму в ПААГ, поступово знижується і становить: АХЕ2 — 26,7±2,50, АХЕ3 — 23,5±7,35, АХЕ4 — 16,8±1,89 і АХЕ5 — 13,1±1,35 %. Подібну залежність виявлено при дослідженні плазми сперми: вміст АХЕ1 — максимальний (35,5±3,23 %), нижчий на

15,7% АХЕ3 і найнижчий АХЕ5 (5,0±0,07%). Слід зауважити, що у плазмі сперми окремих еякулятів кнура проявляються 2–3 ізоформи

АХЕ в концентруючому ПААГ з вмістом менше 1% (рис. 1а, 1б).

Таблиця 3

Вміст ізоформ ацетилхолінестерази в еякулятах плідників, % (n=3, M±m)

Сперма	Ізоформи ацетилхолінестерази (АХЕ) та їх номер, %							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Кнур</i>								
Цільна	30,6±0,95	26,7±2,50	23,5±7,35	16,8±1,89	13,1±1,35	—	—	—
Плазма	35,5±3,23	29,6±2,06	19,8±4,17	6,6±1,12	5,0±0,07	—	—	—
Спермії	100	—	—	—	—	—	—	—
<i>Бугай</i>								
Цільна	27,4±8,44	15,0±2,48	12,4±5,61	7,3±2,38	4,3±1,97	9,5±2,47	7,2±0,95	16,8±2,80
Плазма	6,4±2,47	5,0±1,61	17,7±1,36	34,1±9,78	10,3±6,32	11,1±3,06	5,4±1,97	10,0±1,83
Спермії	1,9±0,58	3,1±1,69	17,5±2,03	29,3±1,89	18,0±1,27	7,3±0,73	6,6±0,90	16,2±1,20
<i>Баран</i>								
Цільна	11,4±3,08	9,8±1,49	11,1±2,76	33,1±8,68	18,1±3,14	9,6±2,91	6,9±1,44	—
Плазма	21,6±8,88	-	3,6±0,85	30,9±10,11	25,9±3,52	11,6±0,72	7,5±2,5	—
Спермії	11,4±8,52	9,5±1,60	19,1±3,82	18,6±3,37	13,2±5,28	14,9±6,73	19,9±3,29	—

Очевидно, вказані ізоформи ензиму мають великий розмір молекули, що можливо, зумовлено утворенням комплексів АХЕ з іншими протеїнами чи ліпідами і, відповідно, зниженням рухливості в електричному полі. У цільній спермі бугая виявлені подібні, до еякулятів кнура, зміни вмісту ізоформ ензиму — зниження величини показника із збільшенням рухливості в ПААГ. При цьому, порівняно з АХЕ1, вміст АХЕ2 і АХЕ3 нижчий, відповідно, на 12,4 і 15,0%, АХЕ4, АХЕ6 і АХЕ7 — на 17,9–20,2% і АХЕ5 — на 23,1%. Найменша різниця виявлена при порівнянні вмісту АХЕ1 і АХЕ8 — 10,6%. На відміну від цільної сперми, у плазмі і сперміях найвищий вміст АХЕ4, відповідно, 34,1±9,78 і 29,3±1,89%. При цьому, у плазмі сперми майже однаковий вміст (5,0–6,4%) АХЕ1, АХЕ2 і АХЕ7, вищий (10,0–11,3%) АХЕ5, АХЕ6 і АХЕ8 і ще більше (17,7%) АХЕ3. У сперміях, порівняно з максимальною величиною показника, нижчий вміст (16,2–18,0%) АХЕ3, АХЕ5 і АХЕ8, ще менше (6,6–7,3%) АХЕ6 і АХЕ7 і найменше (1,9±0,58%) — АХЕ1.

Для еякулятів барана характерний максимальний вміст (33,1±8,68%) АХЕ4, нижчий (18,1±3,14%) — АХЕ5, ще менший (9,6–11,1%) АХЕ2, АХЕ3 і АХЕ6 і найнижчий (6,9±1,44%) АХЕ7. У плазмі сперми, як і еякуляті, максимальна величина (30,9±10,11%) АХЕ4, нижча (21,6 і 25,9%) АХЕ1 і АХЕ5, ще менше (11,6±0,72%) АХЕ6

і найменше (3,6±0,85%) АХЕ3. Особливістю плазми сперми барана є відсутність АХЕ2-ізоформи. Для сперміїв характерний майже однаковий вміст (18,6–19,9%) АХЕ3, АХЕ4 і АХЕ7, менший (11,4–14,9%) АХЕ1, АХЕ5 і АХЕ6 та найменше (9,5±1,60%) АХЕ2.

Таким чином, виявлені особливості активності АХЕ і nХЕ в еякулятах свідчать про різний рівень метаболізму в спермі плідників та важливу роль вказаних ензимів у використанні субстратів і ресинтезу АТФ сперміїв. Вказані відмінності зумовлені видовими особливостями сперми — часткою і біохімічним складом секретів додаткових статевих залоз в еякуляті, які й забезпечують енергетичні потреби і фізіологічну якість сперміїв. При цьому, в регулюванні метаболізму сперміїв (використанні субстратів) беруть різні, за своїми структурними й каталітичною активністю, ізоформи ацетилхолінестерази. Вказане твердження ґрунтується на виявлених особливостях електрофоретичної рухливості ізоформ АХЕ (і, відповідно, розмірі молекул та їх заряді) залежно від виду та індивідуальних особливостей плідників, а також на різній інтенсивності проявлення активних протеїнів ензиму в ПААГ. Оскільки вміст ізоформ АХЕ в еякулятах величина не постійна й залежить від рівня годівлі та інтенсивності використання плідників, очевидно, вказані фактори, впливаючи на активність (вміст активних ізоформ) ензиму,

опосередковано визначають метаболічну активність й запліднювальну здатність сперміїв.

Висновки

1. Сперма кнура характеризується низькою активністю холінестераз (АХЕ — $16,3 \pm 1,44$, нХЕ — $6,0 \pm 0,94$ нмоль/хв×мг білка), барана — високою (відповідно, $67,7 \pm 3,21$ і $25,0 \pm 2,05$ нмоль/хв×мг білка), а бугая — займає проміжне місце (АХЕ — $48,3 \pm 8,72$ і нХЕ — $15,7 \pm 2,37$ нмоль/хв×мг білка).

2. Основна частина активності АХЕ локалізована у плазмі сперми плідників (59,5–81,6 %), а нХЕ — вища активність проявляється (74,8–93,6 %) в сперміях бугая та барана, а у кнура — в плазмі сперми (71,7 %).

3. Для еякулятів бугаїв і баранів характерні 5–6 основних ізоформ АХЕ і 3–4 мінорних, а кнура, відповідно, 3–4 і 2–3.

4. В еякулятах кнура, як і в плазмі сперми вміст ізоформ поступово знижується зі зменшенням розміру їх молекул (зі збільшенням швидкості міграції протеїнів ензиму в ПААГ). У сперміях кнура виявляється тільки одна ізоформа — АХЕ1.

5. У цільній спермі бугая зі збільшенням швидкості міграції протеїнів ензиму в ПААГ поступово знижується вміст ізоформ. На відміну від цільної сперми, у плазмі і сперміях майже 1/3 вмісту ізоформ припадає на АХЕ4 (29,3–34,1 %).

6. Для еякулятів і плазми сперми барана характерний високий вміст (30,9–33,1 %) АХЕ4. У плазмі сперми не виявляється АХЕ2-ізоформа.

7. Кількість і вміст ізоформ АХЕ в спермі зумовлені індивідуальними особливостями, рівнем годівлі та інтенсивністю використання плідників.

Перспективи подальших досліджень.

Вивчити залежності між активністю і вмістом ізоформ ацетилхолінестерази та фізіологічними характеристиками еякулятів.

1. Doliba M. M. *Kholinerhichna rehulyatsiya enerhetychnoho obminu v miokardi i travnykh zalozakh. Avtoref. Diss. dok. biol. nauk* [Cholinergic regulation of energy metabolism in the myocardium and digestive glands. Author. Thesis. Dr. biol. sci. diss.]. Lviv, 1993. 45 p. (In Ukrainian).

2. Hordiy S. K., Ikkert O. V., Kurhalyuk N. M., Tkachenko H. M. ta in. *Neurotransmitery ta*

efektyvnist' dykhannya sekretornykh tkanyn [Neurotransmitters and efficiency of the respiratory secretory tissues]. Lviv, Vydavnychy tsestr LNU imeni Ivana Franka, 2006. 233 p. (In Ukrainian).

3. Karczma A. G. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases. *Chem. Biol. Interactions*, 2010, vol. 187, no. 1–3, pp. 34–43.

4. Zvereva G. V., Chuhriy B. N., Klevets L. A., Uvarova-Gogol T. Ja. Aktivnost atsetilholinesterazy v sperme bykov [Activity of acetylcholinesterase in sperm of bulls] *Doklady VASHNIL*. Moscow, 1987, vol. 8, pp. 33–36 (in Russian).

5. Nelson L. Acetylcholinesterase in bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*, 1964, vol. 7, pp. 65–71.

6. Nelson L. Enzyme distribution in «naturally-decapitated» bull spermatozoa: acetylcholinesterase, adenylypyrophosphatase and adenosinetriphosphatase. *J. Cell. Physiol.*, 1966, vol. 68, pp. 113–116.

7. Sayko A. A. Fiziologicheskaya rol atsetilholina v sperme zhivotnyih [Physiological role of acetylcholine in the sperm of animals]. *Selskohozyaystvennaya biologiya — Agricultural biology*, 1969, vol.4, no 5, pp. 759–765 (in Russian).

8. Nelson L., Metz C. B., Monroy A. Sperm motility in «Fertilization». *Academic Press*, New York., 1967, vol. 1, pp. 27–97.

9. Vlizlo. V. V. *Laboratorni metody doslidzhen u biologiyi, tvarynyystvi ta veterynarniy medytsyni: dovidnyk* [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine: a handbook]. Lviv, SPOLOM, 2012. P. 764 (in Ukrainian).

10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.

11. Karpischenko A. I. *Meditsinskie laboratornyie tehnologii. Spravochnik*. [Medical laboratory technology: a handbook]. S-P., Intermedika, 2002. P. 45–46 (in Ukrainian).

12. Knedel M., Böttger R. Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudocholinesterase (Acylcholinacylhydrolase 3.1.1.8). *Klin Wschr.*, 1967, vol. 45, pp. 325–327.

13. Maynard E. A. Electrophoretic studies of cholinesterases in brain and muscle of the developing chicken. *J. Exp. Zool.*, 1966, vol. 161, pp. 319–336.

14. Plohinskiy N. A. *Byometryya* [Biometrics]. Moscow, MHU, 1970. pp. 358 (in Russian).