

УДК 612.616:544.726

Максим'юк Г. В.[©] канд. біол. наук, ст. наук. співробітник,
e-mail:hanna.maksymjuk@gmail.com

*Львівський національний медичний університет імені Данила
Галицького МОЗ України*

*Інститут землеробства і тваринництва західного регіону НААНУ
(м. Львів)*

МОДИФІКОВАНА І СТАНДАРТИЗОВАНА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ТРАНСПОРТНИХ АТФ-аз ЗА КОНЦЕНТРАЦІЯМИ БІЛКА І ФОСФОРУ В СПЕРМІ

Лабораторіям кріобіологічного і біотехнологічного профілю науково-дослідних установ, закладів вищої освіти, контролюючих організацій, тощо пропонується модифікована і стандартизована методика визначення активності транспортних АТФ-аз, застосування якої дозволяє об'єктивно оцінити рівень функціональної повноцінності сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми.

Ключові слова: сперма, концентрація білка і фосфору, активність АТФ-аз, життєздатність сперматозоїдів.

Вступ. Відомо, що динаміку життєздатності сперматозоїдів нативної і кріоконсервованої сперми слід оцінювати показниками, які об'єктивно характеризують "реакцію-відповідь" статевих клітин на дію ендо- та екзогенних чинників впливу. Однак впроваджені у практику методи визначення їх рухливості та запліднювальної здатності балами і відсотками переважно є окомірними, а отже і суб'єктивними [2, 4, 5]. Тому модифікація, адаптація, розробка і впровадження у практичну та науково-дослідну роботу сучасних методів оцінки функціонального стану сперматозоїдів за біохімічними показниками залишаються актуальним завданням для пізнання і розв'язку існуючих проблем біології та кріобіології сперми [1, 3, 6 – 10].

Отримані об'єктивні параметри оцінки життєздатності сперматозоїдів в умовах заморожування розрідженої сперми до -196°C дозволять створити нові високоефективні захисні середовища, які в майбутньому забезпечать максимально можливе збереження повноцінності їх структури і функцій. У цьому зв'язку автори розробки сподіваються, що модифікований спектрофотометричний метод оцінки функціонального стану сперматозоїдів свіжоотриманої, розрідженої, еквіліброваної та розмороженої сперми запропонованими біохімічними показниками буде корисним для проведення різного роду досліджень аспірантами та науковими співробітниками у кріобіологічних і біотехнологічних лабораторіях науково-дослідних установ, закладів вищої освіти, контролюючих організацій тощо.

Мета роботи. За результатами проведених досліджень впровадити у практичну та науково-дослідну роботу лабораторій кріобіологічного і біотехнологічного профілю об'єктивні біохімічні параметри оцінки функціонального стану сперматозоїдів нативної та кріоконсервованої сперми.

Об'єкт досліджень. Сперма, параметри біохімічних показників оцінки функціонального стану сперматозоїдів за активністю транспортних АТФ-аз нативної, розрідженої, еквіліброваної та розмороженої сперми.

1. Визначення концентрації білка. Проводять за інтенсивністю перебігу біуретової реакції з утворенням забарвленого у фіолетовий колір розчину.

Для визначень застосовують:

а. вимірювальну техніку і допоміжне обладнання – дистиллятор води (скляний), спектрофотометр або фотоелектроколориметр, центрифугу, штатив для пробірок, пробірки (10, 20) см³, піпетки (1, 5) см³, скляні палички, фільтрувальний папір, флакони (300-500) см³, колби мірні (100-1000) см³, циліндри мірні (50-500) см³;

б. реактиви і матеріали – альбумін сироватки крові бугая (АСКБ), ацетон, гідроксид натрію (NaOH), дистильовану воду, сірчанокислу мідь (CuSO₄), хлористий натрій (NaCl).

Для проведення досліджень використовують такі реактиви і розчини.

1. Два рази перегнаний (дистильований) ацетон (C₃H₆O). Молекулярна маса реактиву становить (58, 09).

2. Основний розчин альбуміну сироватки крові бугая (АСКБ). Молекулярна маса реактиву становить (60-70) кДа. В (15-16) см³ дистильованої води вливають у мірний циліндр розчиняють (40,0) мг АСКБ. Після повного розчинення реактиву об'єм розчину доводять дистильованою водою до (20,0) см³. Вихідна (початкова) концентрація АСКБ у розчині становить (2,0) мг/см³.

3. Розчин хлористого натрію (NaCl). Молекулярна маса реактиву становить (58, 44). Розчин готують в мірній колбі на (100,0) см³: (0,85) г NaCl розчиняють у 2/3 частинах об'єму колби заповненої дистильованою водою. Після повного розчинення реактиву об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки. Концентрація NaCl у розчині становить (0,85) % або (0,1) М.

4. Розчин сірчанокислої міді (CuSO₄). Молекулярна маса реактиву становить (159,60), концентрація розчину – (1,0) % або (0,07) М.*

5. Розчин гідроксиду натрію (NaOH). Молекулярна маса реактиву становить (40,00), концентрація розчину – (3,0) % або (0,75) М.*

Підготовка проб сперми і білка. В центрифужну пробірку вливають (1,0) см³ свіжоотриманої нативної або кріоконсервованої сперми, доливають (4,0) см³ розчину NaCl. Отриману суміш охолоджують в холодильнику до температури (3-5) °С. До охолодженої суміші доливають (8,5) см³ два рази перегнаного ацетону. Суміш сперми з реактивами обережно струшують, щільно

Примітка. *Методика приготування розчинів CuSO_4 і NaOH , враховуючи масу їх молекул, аналогічна до розчину NaCl . закривають корками і (2-3) хв витримують в холодильнику. Охолоджені проби сперми за 800 g центрифугують (5,0) хв. Безбілковий центрифугат відсмоктують піпеткою з гумовою грушею. Залишки центрифугату в пробірці забирають смужками фільтрувального паперу.

В центрифужну пробірку з осадом білка вливають (5,0) cm^3 ацетону і (5,0) cm^3 NaCl . Утворену суміш ретельно перемішують і центрифугують. Осад білка декантують. До залишеної чистої маси білка додають (1-2) краплі розчину NaOH . Скляною паличкою осад розмішують до однорідної консистенції і доливають (1-2) cm^3 розчину NaOH . Вміст пробірки переносять в мірну колбу на (50,0) cm^3 і розчином NaCl доводять до мітки. Від отриманого об'єму піпеткою відбирають (1,0) cm^3 розчину білка, який вносять в центрифужну пробірку. До відібраного об'єму розчину білка доливають (3,0) cm^3 розчину NaOH , (2,0) cm^3 розчину CuSO_4 і (4,0) cm^3 дистильованої води. Утворену суміш ретельно перемішують і через (5-10) хв центрифугують.

Чистий фіолетовий розчин біурету колориметрують із світлофільтром (572) нм у кюветах об'ємом (20,0) cm^3 . В якості проби порівняння використовують (3,0) cm^3 розчину NaOH і (2,0) cm^3 розчину CuSO_4 , об'єм яких доводять дистильованою водою до (10,0) cm^3 .

Концентрацію білка у пробах визначають за побудованою кривою калібрувальних розчинів АСКБ № 1-7 заданих (0,50-0,05 mg/cm^3) концентрацій.

Побудова калібрувального графіка. З основного розчину АСКБ вихідної (початкової) концентрації, згідно вимог наведеної таблиці 1, готують калібрувальні розчини № 1–7. Визначення концентрації білка у розчинах проводять аналогічно дослідним пробам. За результатами визначень будують калібрувальний графік.

Таблиця 1.

Показники об'єму компонентів і концентрації білка в калібрувальних розчинах АСКБ

Калібрувальні розчини (№)	Об'єм основного розчину (cm^3)	Об'єм дистильованої води (cm^3)	Концентрація білка (mg/cm^3)
1	3,0	9,0	0,50
2	2,4	9,6	0,40
3	1,5	10,5	0,25
4	1,2	10,8	0,20
5	0,9	11,1	0,15
6	0,6	11,4	0,10
7	0,3	11,7	0,05

Проби розчину білка колориметрують спектрофотометром або фотоелектроколориметром (довжина хвилі 572 нм). Використовують кювети на (20,0) cm^3 . Значення знайденої величини відповідає концентрації білка в (10,0) cm^3 рідини. Вказану величину множать на ступінь розведення (50,0) і знаходять концентрацію білка в (1,0) cm^3 нативної сперми. За отриманими

результатами проведених визначень будують криву калібрувального графіка відкладаючи на осі абсцис (x) показники концентрації білка у розчинах АСКБ ($\text{мг}/\text{см}^3$), на осі ординат (y) – показники шкали приладу (K). Визначену за допомогою калібрувального графіка концентрацію білка (C_6) виражають у $\text{мг}/\text{см}^3$ нативної (свіжоотриманої) сперми.

2. Визначення концентрації неорганічного фосфору. Проводять за інтенсивністю перебігу реакції відновлення ейконогеном фосфорно-молібденового комплексу з утворенням забарвленого у синій колір розчину.

Для визначень застосовують:

а. вимірювальну техніку і допоміжне обладнання – спектрофотометр або фотоелектроколориметр, лабораторну центрифугу, аквадистиллятор, штатив для пробірок, пробірки ($10\text{-}20$) см^3 , пробірки центрифужні ($5\text{-}10$) см^3 , піпетки (1 і 5) см^3 , флакони ($20\text{-}50$) см^3 , колби мірні ($50, 100, 1000$) см^3 , циліндри мірні (25 і 50) см^3 ;

б. реактиви і матеріали – бісульфіт натрію (NaHSO_3), ейконоген (1,2,4-амінонафтолсульфоновою кислотою), молібденовокислий амоній ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), сірчану кислоту (H_2SO_4), сульфат натрію (Na_2SO_3), трихлорцтову кислоту ($\text{Cl}_3\text{C}_2\text{O}_2\text{H}$), фосфорнокислий однозаміщений калій (KH_2PO_4).

Для проведення досліджень використовують такі реактиви і розчини.

1. Розчин молібденовокислого амонію $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$. Молекулярна маса реактиву становить (1235,86), концентрація розчину – (5,0)% або (0,04) М. Мірну колбу місткістю (100,0) см^3 на $2/3$ частини об'єму заповнюють (5,0) г розчином сірчаної кислоти (H_2SO_4). В колбу вносять (50,0) г реактиву, розмішують до повного розчинення і доводять розчином кислоти до мітки.

2. Розчин ейконогену або 1-аміно-2-нафтол-4-сульфонової кислоти ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}$). Молекулярна маса реактиву становить (107,12), концентрація у суміші розчинів – (2,0) % або (0,02) М. Дистильованою водою заповнюють $2/3$ об'єму мірної колби місткістю (50,0) см^3 , розчиняють (6,0) г бісульфіту натрію (NaHSO_3) і додають (0,1) г ейконогену. Утворену суміш енергійно розмішують скляною паличкою до повного розчинення ейконогену.

Окремо, в незначному об'ємі дистильованої води, розчиняють (1,2) г сульфату натрію (Na_2SO_3). Об'єми суміші розчинів NaHSO_3 і ейконогену та розчину Na_2SO_3 змішують і доводять дистильованою водою до мітки. Через (2-3) години виготовлений розчин ейконогену фільтрують. Зберігають розчин у темному хімічному посуді в холодильнику за температури (3-5) $^\circ\text{C}$.

3. Розчин (5,0) н сірчаної кислоти (H_2SO_4). Молекулярна маса реактиву становить (98,09), густина (ρ) – (1,84) $\text{г}/\text{см}^3$. Дистильованою водою заповнюють $2/3$ об'єму мірної колби на (1000,0) см^3 і обережно вливають (140,0) см^3 концентрованої H_2SO_4 . Об'єм розчиненої кислоти у колбі доводять дистильованою водою до мітки.

4. Розчин трихлорцтової кислоти ($\text{Cl}_3\text{C}_2\text{O}_2\text{H}$). Молекулярна маса реактиву становить (163,40), концентрація розчину – (10,0) % або (0,6) М.

Дистильованою водою заповнюють 2/3 об'єму мірної колби на (100,0) см³. У колбі розчиняють (10,0) г Cl₃C₂O₂H і, після повного розчинення реактиву, об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки.

5. Основний стандартний розчин однозаміщеного фосфорнокислого калію (KH₂PO₄). Молекулярна маса реактиву становить (136,09), концентрація розчину – (0,03) М. Дистильованою водою заповнюють 2/3 об'єму мірної колби на (100,0) см³ і розчиняють (0,4389) г KH₂PO₄. Після повного розчинення реактиву об'єм розчину у колбі доводять дистильованою водою до мітки. В (1,0) см³ виготовленого розчину міститься (1,0) мг фосфору.

Із основного розчину готують робочий з концентрацією фосфору (0,02) мг/см³ розчину. Для цього (2,0) см³ основного розчину вносять у мірну колбу на (100,0) см³. Об'єм утвореного розчину доводять дистильованою водою до мітки.

Підготовка дослідної і контрольної проб. У центрифужну пробірку вносять (0,5) см³ свіжоотриманої нативної або кріоконсервованої сперми, (2,0) см³ дистильованої води і (2,5) см³ розчину Cl₃C₂O₂H. Утворену суміш ретельно перемішують. За умов кімнатної (16-18) °С температури витримують (10,0) хв і впродовж (5,0) хв за 800 г центрифугують.

У пробірку відбирають (2,5) см³ чистого прозорого безбілкового центрифугату, доливають (0,5) см³ розчину (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, (0,1) см³ розчину ейконогену і (0,9) см³ дистильованої води. Через (20,0) хв витримання суміші за умов кімнатної температури забарвлений у синій колір розчин фосфорномолібденового комплексу колориметрують. В якості проби порівняння (контроль) використовують (2,5) см³ Cl₃C₂O₂H і (1,5) см³ дистильованої води.

Побудова калібрувального графіка. Згідно з наведеною таблицею 2 із відібраних об'ємів, а саме: (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 і 1,25) см³ робочого розчину KH₂PO₄ готують калібрувальні розчини № 1-5.

Таблиця 2.

Показники об'єму компонентів і концентрації фосфору в калібрувальних розчинах фосфорнокислого калію

Калібрувальні розчини (№)	Об'єм компонентів калібрувальних розчинів (см ³)					Концентрація неорганічного фосфору (мкг/см ³)
	ФКК*	ТХОК*	МКА*	ейконоген	дистильована вода	
1	0,25	1,25	0,5	0,1	1,90	1,25
2	0,50	1,25	0,5	0,1	1,65	2,50
3	0,75	1,25	0,5	0,1	1,40	3,80
4	1,00	1,25	0,5	0,1	0,15	5,00
5	1,25	1,25	0,5	0,1	0,90	6,30

Примітка. * ФКК – робочий розчин фосфорнокислого калію, ТХОК – розчин трихлороцтової кислоти, МКА – розчин молібденовокислого амонію.

Концентрація фосфору у виготовлених розчинах відповідно становить: 1,25, 2,50, 3,80, 5,00 і 6,30 мкг/см³. Калібрувальний графік будують за відкладеними на осі ординат (у) показниками шкали приладу (К), а на осі

абсцис (x) – концентрації фосфору (мкг/см^3). Проби сперми колориметрують спектрофотометром або фотоелектроколориметром. Використовують червоний світлофільтр (660-680) нм і кювету з шириною шару дослідної рідини (10,0) мм. За отриманими для розчинів № 1-5 показниками будують калібрувальний графік. Визначену концентрацію неорганічного фосфору ($C_{\text{фн}}$) виражають у мкг/см^3 .

3. Визначення активності транспортних АТФ-аз. Проводять за визначеними концентраціями фосфору і білка, величина відношень яких характеризує інтенсивність перебігу реакції гідролізу АТФ до АДФ впродовж (30) хв витримання дослідних проб у середовищах інкубації за (37) °С.

Для визначень застосовують:

а. вимірювальну техніку і допоміжне обладнання – спектрофотометр або фотоелектроколориметр, рН-метр (іонометр), центрифугу лабораторну, штативи для пробірок, пробірки (20) см^3 , піпетки (1 і 5) см^3 , флакони (300 – 500) см^3 , колби мірні (200 і 500) см^3 , циліндри мірні (250 і 500) см^3 , лійки, фільтри;

б. реактиви і матеріали – динатрієву сіль аденозин-5'-трифосфорної кислоти ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2$, АТФ), етиленглікольтетраоцтову кислоту ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$, ЕГТА), калій хлористий (KCl), кальцій хлористий (CaCl_2), магній хлористий (MgCl_2), натрій хлористий (NaCl), сапонін (3-[(3-холамідопропіл)-диметиламоній-]-1-пропансульфат, CHAPS), трихлороцтову кислоту ($\text{C}_3\text{H}_5\text{Cl}_3$, ТХОК), трис-НСІ, хлористоводневу кислоту (НСІ).

Для проведення досліджень використовують такі реактиви і розчини.

1. Динатрієва сіль аденозин-5'-трифосфорної кислоти ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2$, АТФ). Молекулярна маса реактиву (551,18).

2. Етиленглікольтетраоцтова кислота ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$, ЕГТА). Молекулярна маса реактиву (380,35).

3 Розчин трихлороцтової кислоти ($\text{C}_3\text{H}_5\text{Cl}_3$, ТХОК). Молекулярна маса реактиву (163,40). У мірну колбу на (100,0) см^3 вливають (50–60) см^3 дистильованої води. Доливають (10,0) см^3 ТХОК і об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки. Концентрація кислоти в розчині становить (10,0) %.

4. Розчин хлористого кальцію, безводного (CaCl_2). Молекулярна маса реактиву (110,99). У мірну колбу на (10,0) см^3 вливають (5–6) см^3 дистильованої води і розчиняють (12,7) мг CaCl_2 . Об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки. Концентрація CaCl_2 в розчині становить (0,13) %.

5. Трис-НСІ – буферна система розчинів № 1 і № 2.

Розчин № 1 (оксиметиламінометану) готують у мірній колбі на (500) см^3 . У колбу вливають (250–300) см^3 дистильованої води, розчиняють (24,2) г вказаного реактиву і після його повного розчинення об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки. Концентрація оксиметиламінометану в розчині становить (4,8) %.

Розчин № 2 (хлористоводневої кислоти, HCl) готують із стандартного розчину фіксаналу або самостійно. У мірну колбу на (1000) см³ вливають (500–600) см³ дистильованої води. Обережно доливають (82,6) см³ HCl з концентрацією (37,3) % і густиною (ρ) 1,185. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки.

До (500) см³ розчину № 1 доливають (170) см³ розчину № 2. Кислотність (рН) виготовленої буферної системи розчинів становить 7,4.

6. Хлористий калій (KCl). Молекулярна маса реактиву (74,56).

7. Хлористий магній, безводний (MgCl₂). Молекулярна маса реактиву (95,22).

8. Хлористий натрій (NaCl). Молекулярна маса реактиву (58,44).

Реакційні та інкубаційні середовища.

Середовище для відмивання сперматозоїдів. У мірну колбу на (100) см³ вливають (50–60) см³ дистильованої води, розчиняють (702,0) мг хлористого натрію і доливають (20,0) см³ буферної системи розчинів № 1 і 2 (рН 7,4). Об'єм виготовленого середовища доводять дистильованою водою до мітки.

Середовище для пермеабілізації мембран. У мірну колбу на (100) см³ вливають (50–60) см³ дистильованої води, розчиняють (400,0) мг сапоніну (CHAPS) і після повного розчинення реактиву об'єм розчину доводять дистильованою водою до мітки. Концентрація CHAPS у розчині становить (0,4) %.

Реакційні середовища № 1, 2, 3. Середовище № 1 служить для визначення сумарної активності Na⁺, K⁺ і Mg²⁺-АТФ-аз (А₁), № 2 – активності Mg²⁺-АТФ-ази (А₂), № 3 – сумарної активності Ca²⁺, Mg²⁺ і Mg²⁺-АТФ-аз (А₃).

Таблиця 3.

Склад, маса і об'єм реакційних середовищ № 1, 2, 3

Склад середовищ	Маса реактивів (мг). Об'єм розчину, буферу, води (см ³)		
	№ 1	№ 2	№ 3
NaCl	876,6	-	-
KCl	279,6	1398,0	1398,0
MgCl ₂	59,5	59,5	59,5
Розчин CaCl ₂	-	-	2,0
Трис-HCl (рН = 7,4)	20,0	20,0	20,0
Вода дистильована до	100,0	100,0	100,0

Згідно з наведеними у таблиці 3 вимогами в (50–60) см³ дистильованої води, влітої у три мірні колби на (100) см³, розчиняють вказану кількість відповідних реактивів. Після їх повного розчинення об'єм реакційних середовищ доводять дистильованою водою до мітки.

Інкубаційні середовища № 1, 2, 3. У кожен пробірку вносять (0,8) см³ реакційних середовищ № 1, 2, 3, додають (2,75) мг АТФ і (0,2) см³ суспензії пермеабілізованих мембран відмитих сперматозоїдів. До вмісту пробірки № 2 додатково вносять (38) мг ЕГТА.

Підготовка проб до досліджень. Для відокремлення плазми від сперматозоїдів у центрифужну пробірку вносять (2,0) см³ свіжоотриманої нативної або кріоконсервованої сперми, яку центрифугують впродовж (5,0) хв за (800) g. Відокремлений супернатант зливають, а осад ресуспендують у (2,0) см³ середовища для відмивання сперматозоїдів. Операцію з відмивання сперматозоїдів повторюють три рази.

Для пермеабілізації мембран до осаду сперматозоїдів доливають (0,2) см³ охолодженого до (3–4) °С розчину сапоніну. Осад перемішують гомогенізатором і витримують впродовж (5–10) хв.

У пробірки № 1, 2, 3 вносять (0,2) см³ осаду мембран дослідної проби. До осаду доливають (0,8) см³ реакційних середовищ і додають (2,75) мг АТФ. Впродовж (30) хв дослідні проби витримують у водяній бані або термостаті за (37) °С.

Перебіг реакції зупиняють охолодженням до (3–4) °С (10,0) % розчином ТХОК. До інкубаційних середовищ доливають (1,0) см³ ТХОК, вміст пробірок перемішують і фільтрують. Суспензію відмитих сперматозоїдів, а саме: (0,1) см³ осаду пермеабілізованих мембран внесеного у (0,4) см³ дистильованої води використовують для спектрофотометричного або фотоколориметричного визначення концентрації білка; (1,0) см³ фільтрату – для визначення концентрації фосфору.

Визначення активності транспортних АТФ-аз проводять в **інкубаційних середовищах № 1, 2, 3**. Сумарну активність Na⁺, K⁺- та Mg²⁺-АТФ-аз (**A₁**), активність Mg²⁺-АТФ-ази (**A₂**) та сумарну активність Ca²⁺, Mg²⁺- і Mg²⁺-АТФ-аз (**A₃**) вираховують за формулою (1). Звідси за формулою **A₄ = A₁ - A₂** (2) знаходять активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази, а за формулою **A₅ = A₃ - A₂** (3) – активність Ca²⁺, Mg²⁺-АТФ-ази.

$$A_{1,2,3} = \frac{C_{\Phi_n}}{0,2 \cdot C_b \cdot 30}, \quad (1)$$

- де, **A_{1,2,3}** - активність АТФ-аз (мкг Φ_n/мг білка · хв),
C_{Φn} - концентрація неорганічного фосфору (мкг),
C_b - концентрація білка (мг),
0,2 - коефіцієнт перерахунку на мг білка,
30 - час гідролізу проби (хв).

Застосовані для визначень реактиви мають бути кваліфікації х.ч. або ч.д.а. Розчини готують самостійно або користуються набором стандартних середовищ (реактивів). Можна використовувати іншу вимірювальну техніку, яка за якісними характеристиками не гірша за наведену.

За кінцевий результат приймають отриману з трьох визначень середньо-арифметичну величину (**M**). Похибка результатів визначень не повинна перевищувати ±5 %.

Література

1. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике / А. М. Горячковский. – Одесса: Экология, 2005. – 607 с.
2. ГОСТ 20909.3-75 – ГОСТ 20909.6-75. Сперма быков неразбавленная: методы испытаний. – Введ. 19. 09. 75. М. : [Б. и.], 1975. – 50 с.
3. Диагностика мужского бесплодия (методические рекомендации) / Минздрав. УССР ; [И. Ф. Юнда, Ю. И. Кушнирук]. – К. : [Б. и.], 1973. – 24 с.
4. Мешкова Н. П. Практикум по биохимии животных / Н. П. Мешкова, С. Е. Северин. – М. : Советская наука, 1950. – С. 168–169.
5. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / Ін-т біології тварин УААН, Науково-методичний центр "Фізіологія тварин" ; [Л.В. Андрєва та ін.]. Вид. 3-тє, переробл. і доповн. – Львів: [Б. в.], 2004. – 401 с.
6. Asch R. H Gamete physiology /Asch R. H., Balmaceda J. P., Johnston I. – Norvell, USA, 1990. – 354 p.
7. Esmann M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺-K⁺-ATPase: Molar and specific activity, protein determination. / M. Esmann. Methods Enzymol. – 1988. – V. 156 (Part P) – P. 105 – 115.
8. Lowry O. H., Rosebrough J. H., Farr A. L. and Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent./ O. H. Lowry et al. J. Biol. Chem. – 1951. – V.193. – P. 265 – 275.
9. Pradip K. Sarkar A quick assay for Na⁺-K⁺-ATPase specific activity / K. Pradip, A. Sarkar. Z. Naturforsch. – 2002. –V. 57c. – P.562 – 564.
10. World Health Organisation: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen Cervical Mucus Interaction. / Cambridg: University press, 1992. – P. 3 – 27.

Summary**Maksymyuk H.V. PhD***e-mail:hanna.maksymjuk@gmail.com***Lviv National Medical University*****Institute of Agriculture and Stock-Breeding of Western Region UAAS*
MODIFIED AND STANDARDIZED METHOD OF DETERMINING
TRANSPORT ATP-ASES ACTIVITY BY PROTEIN AND PHOSPHORUS
CONCENTRATION IN SEMEN**

Laboratories with cryobiological profile and biotech research institutions, universities, regulatory organizations, etc. are offered a modified and standardized method of determining the activity of transport ATP-ases which allows to objectively assess the level of functional full-value of native sperm and cryoconserved sperm.

Key words: *sperm, concentration of protein and phosphorus, the activity of ATP-ases, sperm viability.*

Стаття надійшла до редакції 23.03.2010