



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15654 (13) U

(51) МПК (2006)  
G01N 33/573  
G01N 33/66  
G01N 33/52  
C12N 9/44  
A61P 15/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ НЕЙТРАЛЬНОЇ  $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗИ В ЕЯКУЛЯТІ

1

2

(21) u200512764

(22) 29.12.2005

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. №7, 2006р.

(72) Сербіна Ірина Євгенівна, Нуріманов Каміль  
Раїсович, Мигаль Людмила Якимівна, Нікуліна  
Галина Григорівна

(73) ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті, який включає використання мальтози як субстрату та припинення ферментативної реакції шляхом термоінактивації, який відрізняється тим, що активність нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази визначають в еякуляті, який розводять фізіологічним розчином у 20 разів та час термоінактивації збільшують удвічі.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до сексопатології, і може бути використаний для діагностики чоловічої безплідності.

В сучасній сексопатології важливе значення має розвиток методів, які розширюють діагностичні можливості. Але недоліком багатьох з них є інвазивність і, відповідно, травматичність для хворого, тому поява нових, саме неінвазивних діагностичних методів завжди набуває особливу цінність. Важлива роль при цьому належить нейтральній  $\alpha$ -глюкозидазі, яка в значній кількості продукується в епідидимусі, тому її можна вважати маркером придатка яєчка.

Відомий спосіб - визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті [1] з використанням в якості субстрату р-нітрофенолу- $\alpha$ -глюкопіранозиду і в якості інгібітору - кастаносперміну. Висока активність цього ензиму в сім'яній плазмі свідчить про прохідність сім'яного тракту, знижена активність або відсутність активності слугує діагностичним критерієм порушення проксимальної (епідидимальної) прохідності, що лежить в основі екскреторно-обтураційної форми чоловічої безплідності.

Недоліком способу є те, що реактиви, які застосовують при його виконанні, не виробляють в Україні, дорого коштують та існують певні труднощі в їх придбанні.

Відомо, що синонімом нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази (К.Ф. 3.2.1.20) є мальтаза, тому що нейтральна  $\alpha$ -глюкозидаза в нейтральному середовищі розщеплює мальтозу (вуглевод, який складається із двох залишків глюкози, з'єднаних глікозидним зв'язком.) з утворенням глюкози. Швидкість приросту глюкози є мірою активності ферменту.

Відомий спосіб визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в сечі при патології нирок [2], взятий нами за прототип, який включає визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази фотокolorиметричним методом з використанням мальтози в якості субстрату та припинення ферментативної реакції шляхом термоінактивації, а саме - кип'ятінням.

Недоліком способу є те, що визначення проводять в сечі при патології нирок.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті шляхом його розведення фізіологічним розчином у 20 разів, використанням мальтози в якості субстрату, збільшенням удвічі часу термоінактивації для припинення ферментативної реакції та застосування глюкозооксидазного методу для подальшого визначення утвореної глюкози фотокolorиметричним методом, що спрощує процес диференційної діагностики азооспермії з використанням малого

(13) U

(11) 15654

(19) UA

об'єму еякуляту із зменшенням впливу інгібітору на досліджуваній фермент.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті, який включає використання мальтози в якості субстрату та припинення ферментативної реакції шляхом термоінактивації, згідно з корисною моделлю, активність нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази визначають в еякуляті, який розводять фізіологічним розчином у 20 разів та час термоінактивації збільшують удвічі.

Спосіб визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті виконують таким чином: для дослідження використовують сім'яну плазму, одержану після центрифугування цільного еякуляту при 3000 обертах за хвилину впродовж 10 хвилин. Сім'яну плазму розводять у 20 разів, для чого до 0,05мл сім'яної плазми додають 0,95мл фізіологічного розчину. Розведений розчин сім'яної плазми ретельно струшують. Надалі для аналізу використовують лише розведений розчин сім'яної плазми. Для визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази готують субстратно-буферний розчин (8,3мМ розчин мальтози готують на 0,2М фосфатному буфері, рН 6,5), для чого 30мг мальтози (М.м. мальтози - 342у.о.) розчиняють у 10мл 0,2М фосфатного буферу. У дві пробірки (дослідну і контрольну) вносять 0,2мл субстратно-буферного розчину. В дослідну пробірку додають 0,1мл розведеної у 20 разів сім'яної плазми і інкубують 30 хвилин в термостаті ( $t + 37^{\circ}\text{C}$ ). В контрольну пробірку сім'яну плазму додають після інкубації. Обидві пробірки щільно закорковують і ставлять на 6 хвилин в киплячу водяну баню для термоінактивації ферментів. Після кип'ятіння ферментативна реакція утворення глюкози із мальтози припиняється внаслідок денатурації ферментів. Проби охолоджують. Кількість глюкози, що утворилася внаслідок ферментативної реакції, визначають специфічним глюкозооксидазним методом з використанням існуючих стандартних наборів для визначення глюкози в біологічних рідинах. В охолодженій контрольній і дослідній пробірці з реакційною сумішшю додають 1мл робочого розчину, який готують за інструкцією до набору. Забарвлення розвивається за 15 хвилин при  $37^{\circ}\text{C}$  і стійке протягом 1 години. Під час розвитку забарвлення проби декілька разів інтенсивно струшують, інтенсивність забарвлення пропорційна кількості глюкози в пробі. Оптичну щільність дослідної проби визначають проти контрольної проби на ФЕК-56 М або на спектрофотометрі при довжині хвилі 510нм (470-540нм, зелений світлофільтр №5) в кюветі з довжиною оптичного шляху 3мм.

Активність нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в дослідних пробах розраховують в залежності від величини екстинкції дослідної проби з урахуванням ступеню розведення біоматеріалу.

У практично здорових осіб показники активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в сім'яній плазмі, визначеної способом, що пропонується, становлять 20-45мкмоль/с.л. Діапазон активностей, що визначають, становить - 0,8-70мкмоль/с.л

Необхідність розведення еякуляту викликана високою активністю нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в

сім'яній плазмі, до того ж це дає певні переваги: по-перше, для аналізу використовують малу кількість біоматеріалу (0,05мл), що важливо, коли кількість біоматеріалу обмежена, по-друге, цільна сім'яна плазма - густа малопрозора рідина, і використання її в нативному стані впливає на прозорість реактивної суміші, що, в свою чергу, зумовлює отримання хибних результатів, через збільшення оптичної густини реактивної суміші, і, по-третє, розведення біоматеріалу значно зменшує вплив інгібіторів ферменту, які можуть бути в еякуляті деяких пацієнтів, що збільшує вірогідність отримання достовірних результатів.

Збільшення часу, необхідного для термоінактивування ферменту пов'язане з тим, що на відміну від сечі, еякулят містить велику кількість білка ( $40 \pm 2\text{г/л}$ ), і за 3 хвилини не відбувається повної денатурації білка і, відповідно, повної термоінактивації ферменту, а отже при визначенні кількості утвореної глюкози: специфічним глюкозооксидазним методом після додавання робочої суміші на кінцевому етапі дослідження ферментативна реакція розщеплення мальтози з утворенням глюкози триває, інтенсивність забарвлення, що розвивається, продовжує збільшуватись, і це призводить до завищення отриманих результатів.

Практичне використання способу, що пропонується, проведено в лабораторії біохімії та клініці відділу сексопатології та андрології Інституту урології АМН України на 66 пацієнтах з азооспермією (34 з екскреторно-обтураційною формою безплідності і 32 з секреторною формою) і 31 пацієнт з нормоспермією.

Наводимо приклади практичного застосування запропонованого способу.

Приклад 1. Пацієнт Ю., і.х. №1226, звернувся в клініку у зв'язку з безплідністю в шлюбі. Жінку обстежено гінекологом - здорова. При об'єктивному обстеженні пацієнта ріст волосся за чоловічим типом. Яєчка та придатки в мошонці задовільних розмірів, безболісні, придатки ущільнено. За результатами ультрасонографії ознаки дистальної обструкції відсутні. В аналізі еякуляту виявлено азооспермію. Активність нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті за запропонованим способом становила 2,4мкмоль/с.л. Тестостерон сироватки крові - 6,2нг/мл (норма 3,0-12,0нг/мл). Фолікулостимулюючий гормон сироватки крові - 4,8мМО/мл (норма 1,5-5,84мМО/мл). При дослідженні біоптату яєчка в просвіті більшості сім'яних каналців визначається біля 10 сперматозоїдів. Заключний діагноз: екскреторно-обтураційна безплідність. Рекомендовано операцію епідидимова-занастомозу.

Приклад 2. Пацієнт У., і.х. №2217, звернувся в клініку у зв'язку з безплідністю в шлюбі. Жінку обстежено гінекологом - здорова. При об'єктивному обстеженні пацієнта ріст волосся за чоловічим типом. Яєчка та придатки в мошонці задовільних розмірів та консистенції, безболісні. В аналізі еякуляту виявлено азооспермію. Активність нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті за запропонованим способом становила 27,3мкмоль/с.л. Тестостерон сироватки крові 3,0нг/мл (норма 3,0-12,0нг/мл). Фолікулостимулюючий гормон сироватки крові 5,2мМО/мл (норма 1,5-5,84мМО/мл). При

дослідженні біоптату яєчка визначають блок сперматогенезу на рівні сперматоцитів II порядку. Заключний діагноз: секреторна безплідність. Рекомендовано штучну інсемінацію спермою донора.

Таким чином, запропонований спосіб визначення активності нейтральної  $\alpha$ -глюкозидази в еякуляті дозволяє ефективно проводити діагностику прохідності сім'явивідного тракту, є дуже простим і не трудомістким у виконанні, необхідні реагенти доступні, виконання способу потребує невелику кількість часу та біоматеріалу для дослідження. Чутливість способу 93%.

Джерела інформації, прийняті до уваги при експертизі

1. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Madrid: Medica Panamericana; 2001.

2. Лукомская И.С., Лавренова Т.П., Томилина Н.А., Зубкин Н.Л., Федорова Н.Д. Диагностическое значение определения активности нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы в моче при патологии почек // Вопр. мед. химии. - 1986. - №5 - С.112-119 (прототип).