УДК 636.2:577.15:612.616.

ІЗОФОРМИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ПРИ ІНКУБУВАННІ ЕЯКУЛЯТІВ БУГАЇВ

Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів, І. М. Яремчук

Інститут біології тварин НААН України

Вивчали ізоферментний спектр супероксиддисмутази в процесі інкубування еякулятів бугаїв. Встановлено, що для сперми бугаїв характерні 5 ізоформ СОД, які відрізняються між собою електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю їх прояву. Спектр СОД-ізоформ змінюється в процесі інкубування сперми бугаїв: вміст S1- та S2-ізоформ вірогідно ($p < 0,001$) зростає зі збільшенням часу інкубування, а S4-, навпаки, зменшується ($p < 0,001$). При цьому існує сильна пряма кореляція між тривалістю інкубування та вмістом S1, S2- і обернена — з S4 ізоформами. Зі збільшенням часу виживання сперміїв вміст S1- і S2-ізоформ СОД вірогідно зростає, досягаючи максимуму на третю добу при виживанні сперміїв менше 100 год, а при більше 100 год — на четверту. Вміст S4-ізоформи СОД вірогідно знижується ($p < 0,001$) на другу добу інкубування при виживанні сперміїв менше 100 год, а при величині фізіологічного показника більше 100 год — на третю. Між виживанням сперміїв та вмістом S1-, S2-ізоформ існує сильна пряма кореляція ($\eta^2_{S1}=0,84–0,91$, $\eta^2_{S2}=0,93–0,89$), для S4-ізоформи — обернена ($\eta^2_{S4}=0,90–0,85$).

Ключові слова: СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ІЗОФОРМИ, ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ, СПЕРМА, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Після еякуляції, спермії піддаються оксидативному стресу. При цьому, фізіологічно, активується окисний метаболізм статевих клітин, що забезпечує прояв акросомної реакції і капацитації [1, 2]. Проте, дисбаланс процесів окиснення викликає гіперактивацію клітин, руйнування мембран і загибель сперміїв [3, 4]. На сьогоднішній день встановлено, що в еякулятах існує система антиоксидантного захисту, компоненти якої контролюють процеси утворення та знищення активних форм кисню (АФК) та їх цитотоксичних продуктів. Одним з ключових ферментів, що регулює нагромадження АФК є супероксиддисмутаза (СОД). Доведено, що СОД забезпечує захист мембранних структур статевих клітин, підтримує їх рухливість та подовжує час виживання, підвищує запліднюючу здатність і, в цих процесах, важливе значення відіграють її ізоформи [5, 6].

В зв’язку з цим в еякулятах бугаїв вивчали ізоформи СОД, їх зміни в процесі виживання сперміїв.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв голштинської породи (n=7), які належать НВО «Західплемресурси». У спермі свіжоотриманій та інкубованій при температурі +2–4 °С (на першу, другу, третю та четверту доби) вивчали спектр білків СОД (%) і виживання сперміїв (год.) до припинення прямолінійного поступального руху. Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу у 10 % поліакріламідному гелі (ПААГ), для чого цільну сперму розбавляли 1:4 Трис-гліциновим буфером; додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (концентрація білка 50–100 мкг). Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp і Fridovich [7] у нашій модифікації [8]: після електрофорезу ПААГ пластини занурювали в розчин, що містив 1,23 мМ нітросинього тетразолію (НСТ) у 0,15 М Na/K фосфатному буфері, (pH 7,8) на 15 хв у темноті при кімнатній температурі і тричі промивали дисцильованою водою. Потім заливали інкубаційним середовищем, що містило — 28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавін у 0,15 М Na/K фосфатному буфері (pH 7,8). Інкубували в

темноті протягом 20 хв. Після чого пластини гелю промивали дистильованою водою і опромінювали світлом 7 хв для генерації супероксиданіонрадикалів рибофлавіном. У результаті фотохімічної реакції відновлення НСТ до нітроформазана супероксидними аніонрадикалами пластини набували темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими унаслідок перетворення супероксиданіонрадикалів СОД.

Результати й обговорення

У спермі бугаїв виявлено п'ять ізоформ СОД, які за швидкістю руху у 10 % ПААГ позначили, від найменш - до максимально рухливої, як S1, S2, S3, S4 та S5 (рис. 1). При цьому, найвищим вмістом характеризувалася S4-ізоформа (76,8±2,66 %), меншим — S5 (8,1±1,20 %), ще нижчим, і майже однаковим, S2 та S3 (6,3±0,70 та 5,7±0,80 %), а найменше було S1-ізоформи (3,1±0,75 %).

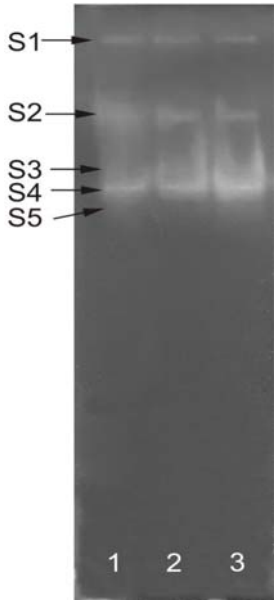

Рис. 1. Ізоферментний спектр СОД сперми бугаїв (S1, S2, S3, S4, S5 ізоформи СОД; 1, 2, 3 треки — цільна сперма бугаїв)

У процесі інкубування сперми при температурі +2–4 °С ізоферментний склад СОД змінюється. Так, на другу добу інкубування, в порівняні з першою, зростає вміст S1- і S2-ізоформ, відповідно, на 5,2 % ($p < 0,05$) та 10,4 % ($p < 0,001$), і зменшується S4 — на 15,7 % ($p < 0,001$; рис. 2).

На третю та четверту добу інкубування вміст S1- і S2-ізоформ ще збільшується, відповідно, на 11,4 % і 20,5 % ($p < 0,001$) та на 12,6 % і 16,2 % ($p < 0,001$), а S4-ізоформи — знижується на 29,3 % ($p < 0,001$) та 29,0 %($p < 0,001$).

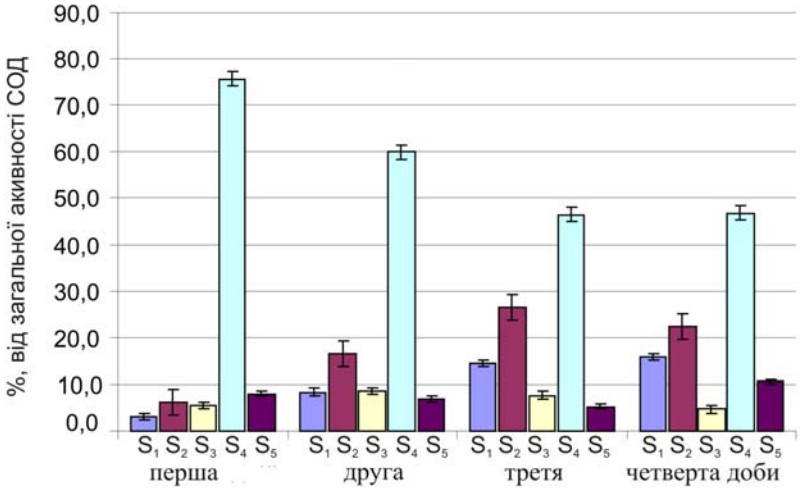

Рис. 2. Вміст ізоформ СОД сперми бугаїв при інкубуванні (S1,S2, S3, S4, S5 — ізоформи ферменту)

Вміст S3-ізоформи вірогідно зростає на 3,0 % ($p < 0,05$) тільки на другу добу інкубування, а вміст S5 — зменшується на 2,8 % ($p < 0,05$) на третю і зростає на 2,4 % ($p < 0,05$) на четверту добу. Такі суттєві зміни ізоферментного спектру СОД свідчать про нагромадження АФК при інкубуванні сперми, що призводить до перерозподілу чи змін функцій (активування) окремих ізоформ ферменту. Із аналізу кореляції випливає, що між тривалістю інкубування та вмістом ізоформ СОД існує сильна залежність: для S1- і S2 — пряма, а для S4 — обернена. Кореляційне відношення за часом інкубування для вказаних ізоформ становило, відповідно, $\eta^2_{S1}=0,68$, $\eta^2_{S2}=0,75$, $\eta^2_{S4}=0,67$.

Аналіз результатів змін ізоформ СОД залежно від тривалості виживання сперміїв свідчить, що у еякулятах з величиною фізіологічного показника менше 100 год на другу добу інкубування, в порівняні з першою, зростає вміст S1-ізоформи на 9,2 %, а при більше 100 год — на 2,3 %, досягаючи свого максимуму, відповідно, на третю (16,7±0,74 %) та четверту доби (16,4±2,23 %; табл. 1). Отже у спермі з вищою величиною фізіологічного показника вміст S1-ізоформи змінюється менше.

Таблиця 1

Вміст білків СОД сперми бугаїв в зв'язку з виживанням сперміїв, (M±m), %

Виживання сперміїв, год	Ізоформи СОД	Доби інкубування:			
		перша	друга	третя	четверта
> 100	S1	1,9±0,25	4,2±1,00**	12,4±1,73***	16,4±2,23***
< 100		4,7±1,24	13,9±0,38***	16,7±0,74***	15,1±0,70***
> 100	S2	4,9±0,70	10,5±1,38***	22,7±0,88***	21,6±1,73***
< 100		7,6±0,68	24,4±1,09***	25,4±1,37***	23,9±2,11***
> 100	S3	6,2±1,23	7,1±0,68	8,9±1,44**	5,0±0,41
< 100		4,6±0,59	10,4±0,33***	6,4±1,56	4,4±0,45
> 100	S4	76,1±3,15	71,6±2,06	45,6±0,62***	46,5±2,24***
< 100		75,1±4,54	44,4±1,32***	47,2±2,95***	47,0±2,44***
> 100	S5	10,6±0,62	6,8±1,03	5,3±1,12**	10,5±1,82
< 100		4,6±0,53	6,9±0,55	5,3±0,26	10,5±1,41***

Примітка: ** — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$ різниця статистично вірогідна порівняно з першою добою

Вміст S2-ізоформи СОД на другу добу інкубування у зразках з виживання сперміїв менше 100 год. збільшується на 16,8 %, і в подальшому не змінюється, а при величині фізіологічного показника більше 100 год зростає на 17,8 % (перша доба — 4,9±0,70 %, третя доба — 22,7±0,88 %). Подібні зміни виявлені при вивченні S3-ізоформи СОД: при виживанні статевих клітин менше 100 год вміст її вірогідно зростає на другу добу інкубування (на 5,8 %; $p < 0,001$), а при більше 100 год — на третю (на 2,7 %; $p > 0,05$). При цьому, вміст S4-

ізоформи зменшується на однакову величину (31,0 %; $p < 0,001$) на другу добу в еякулятах з виживання сперміїв менше 100 год і на третю — з часом більше 100 год.

Вміст S5-ізоформи зростає з 4,6±0,53 до 10,5±1,41 % (5,9 %; $p < 0,01$) протягом всього часу інкубування з виживанням сперміїв менше 100 год., тоді ж як при величині фізіологічного показника більше 100 год. — зменшується на другу та третю доби, відповідно, на 3,8 % та 5,3 % ($p<0,001$), а на четверту — зростає на 5,2 % і повертається до вихідного значення (10,5±1,82 %). Із аналізу кореляції випливає, що між тривалістю виживання сперміїв та вмістом ізоформ СОД існує сильна залежність: для S1- і S2-ізоформ — пряма, а для S4 — обернена. Кореляційне відношення за виживанням сперміїв для вказаних ізоформ становило, до 100 год і більше 100 год, відповідно, η^2_{S1}=0,91 і 0,84, η^2_{S2}=0,89 і 0,93, η^2_{S4}=0,85 і 0,90.

Отже, зміни ізоформ СОД, відносно часу виживання сперміїв, характеризують напруженість окисних процесів в еякулятах бугаїв та свідчать про потенційну здатність статевих клітин регулювати використання субстратів, утворення і знищення АФК для забезпечення основної функції — запліднити ооцит.

Висновки

1. У спермі бугаїв виявлено 5 ізоформ СОД, які відрізняються між собою за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю прояву.
2. Ізоферментний спектр СОД змінюється в процесі інкубування сперми бугаїв: вміст S1- та S2-ізоформ вірогідно ($p < 0,001$) зростає зі збільшенням часу інкубування, а S4- навпаки, зменшується ($p < 0,001$).
3. Встановлена сильна пряма кореляція між часом інкубування та вмістом S1-, S2- і обернена — з S4-ізоформи.
4. Вміст S1- і S2-ізоформ СОД вірогідно зростає зі збільшенням часу виживання сперміїв, досягаючи свого максимуму при тривалості виживання сперміїв менше 100 год на третю, а при більше 100 год — на четверту доби.
5. Вміст S4 ізоформи СОД вірогідно знижується ($p < 0,001$) при виживанні сперміїв менше 100 год на другу добу інкубування, а при величині фізіологічного показника більше 100 год — на третю.
6. Встановлена сильна пряма кореляція між часом виживанням сперміїв та вмістом S1-, S2-ізоформ (η^2_{S1}=0,91–0,84, η^2_{S2}=0,89–0,93) і обернена з S4-ізоформою (η^2_{S4}=0,85–0,90).

Перспективи подальших досліджень. Вивчення напруженості окисних процесів в еякулятах бугаїв та потенційної здатності статевих клітин для регулювання використання різних субстратів з метою забезпечення основної функції — запліднити ооцит.

N. V. Kuz'mina, D. D. Ostapiv, I. M. Yaremchuk

SUPERPXIDEDISMUTASE ISOFORMS AT BULL EJACULATES INCUBATION

S u m m a r y

Isoenzyme superoxidedismutase spectrum in bulls' ejaculates incubation process was studied. It was established that 5 superoxidedismutase isoforms are characteristic for sperm and they differ by electrophoresis' activity and display intensity. SOD-isoforms spectrum changes in bulls' sperm incubation process: S1 and S2 isoforms ($p < 0,001$) content probably increases with incubation time increase and S4 — to the contrary decreases ($p < 0,001$). Strong direct correlation exists between incubation duration and S1 and S2 content, and inverse with S4 isoforms. With spermatozoa incubation time increase content of S1 and S2 isoforms SOD probably increases reaching it's maximum on the third day at spermatozoa survival more than 100 hours, and more than 100 hours — on the 4th. Content of S4-isoform SOD probably decreases ($p < 0,001$) on the second day of incubation at spermatozoa survival less than 100 hours and at physiologic indices more than 100 hours on third. Between the survival of spermatozoa and maintenance of S1-, S2-izoforms strong direct correlation exists (η^2_{S1}=0,84–0,91, η^2_{S2}=0,93–0,89), for S4-izoform — reverse (η^2_{S4}=0,90–0,85).

Н. В. Кузьмина, Д. Д. Остапив, И. М. Яремчук

ІЗОФОРМЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПРИ ИНКУБАЦИИ ЭЯКУЛЯТОВ БЫКОВ

А н н о т а ц и я

Изучали изоферментный спектр супероксиддисмутазы в процессе инкубирования эякулятов биков. Установлено, что для спермы быков характерны 5 изоформ СОД, которые отличаются между собой по электрофоретической подвижности и интенсивности проявления. Спектр СОД-изоформ изменяется в процессе инкубирования спермы быков: содержание S1- и S2-изоформ достоверно ($p < 0,001$) увеличивается по мере увеличения времени инкубирования, а S4 — наоборот уменьшается ($p < 0,001$). При этом существует сильная прямая корреляция между продолжительностью инкубирования и содержанием S1, S2- и обратная с S4-изоформами. С увеличение времени инкубирования спермиев содержание S1- і S2- изоформ СОД достоверно возростает, достигая своего максимума на третьи сутки при выживании спермиев меньше 100 час., а при больше 100 час. — на четвертые. Содержание S4-изоформы СОД достоверно уменьшается ($p<0,001$) на вторые сутки инкубирования при выживаннии спермиев меньше 100 час., а при величине физиологического показателя больше 100 час. — на третьи. Между выживанием спермиев и содержанием S1-, S2-изоформ существует сильная прямая корреляция (η^2_{S1}=0,84–0,91, η^2_{S2}=0,93–0,89), для S4-изоформы — обратная (η^2_{S4}=0,90–0,85).

1. *Vernet P*. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa1 [Text] / P. Vernet, N. Fulton, R. Aitken // Biology of Reproduction. — 2001. — Vol. 65. — P. 1102–1113.

2. *Aitken J.* Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa [Text] / R. J. Aitken, A. L. Ryan, M. A. Baker, E. A. Laughlin // Free Radic Biol Med. — 2004. — Vol. 36. — P. 994–1010.

3. *Ozgocmen S.* Antioxidant status and lipid peroxidation in seminal plasma and spermatozoa of patients with ankylosing spondylitis [Text] / S. Ozgocmen, S. Sogut, E. Fadillioglu et al. // Rheumatology. — 2003. — Vol. 42. — P. 805–807.

4. *Thimmappa R.* Induction of Oxidative Stress by Organic Hydroperoxides in Testis and Epididymal Sperm of Rats In Vivo [Text] // Journal of Andrology. — 2007. — Vol. 28. — P. 41533–41545.

5. *Awda B. J.* Reactive Oxygen Species and Boar Sperm [Text] / B. J. Awda, M. Mackenzie-Bell, M. M. Buhr // Function Biol Reprod — 2009. — Vol. 81. — P. 553–561.

6. *Roca J.* Survival and In Vitro Fertility of Boar Spermatozoa Frozen in the Presence of Superoxide Dismutase and/or Catalase [Text] / J. Roca, M. Rodríguez, M. Gil et. al. // Journal of Andrology. — 2005. —Vol. 26, No.1. — P. 214–217.

7. *Beauchamp C.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [Text] / C. Beauchamp, I. Fridovich // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276–287.

8. *Кузьміна Н. В.* Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в різних органах і крові корів / Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів // Біологія тварин. — 2008. — № 12. — С. 423–429.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення ВРХ, доктор с.-г. наук І. В. Вудмаска.