

АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОФОРМ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ТА ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ В ЕЯКУЛЯТАХ БУГАЇВ ЗА РІЗНОГО ОКИСНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

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

Інститут біології тварин НААН

У свіжоотриманих та збережених 24 год., при температурі 0–4 °С в атмосфері азоту і за аерації в еякулятах бугаїв досліджували активність та вміст ізоформ супероксиддисмутази (СОД). Встановлено, що активність СОД у свіжоотриманій спермі бугаїв становить $7,3 \pm 0,5$ МО/мг протеїну та знижується на 13,7 % за інкубування в атмосфері азоту і на 28,8 % за аерації. При цьому, сила залежності активності ензиму від умов інкубування становить, відповідно, $\eta^2 = 0,65$ і $0,92$. Встановлено, що активність СОД у спермі бугаїв реалізується п'ятьма ізоформами, які за швидкістю руху у 10 % поліакриламідному гелі позначили (від найменш – до максимально рухливої) S1, S2, S3, S4 та S5. За дефіциту чи надлишку акцептора електронів, порівняно з контролем, виявлено подібні зміни електрофоретичної рухливості ізоформ СОД. Вміст S1 і S2-ізоформ знижується, відповідно, на 0,4 і 3,5 % ($P < 0,001$) за атмосфери азоту та на 15,5 ($P < 0,001$) і 3,1 % за аерації. Одночасно, вміст S3, S4 та S5-ізоформ зростає: за атмосфери азоту, відповідно, на 5,7 ($P < 0,05$), 4,2 і 6,2 % ($P < 0,05$) і за аерації — на 1,9, 2,6 і 2,2 %. Зміни активності та спектру ізоформ СОД супроводжуються зниженням тривалості виживання спермій: за аерації - на 24 год. (23 %), а при інкубуванні в атмосфері азоту — на 16 год. (15 %), порівняно з контролем.

Одним із факторів, що визначає величини біохімічних показників та якість спермій є присутність в спермі акцептора електронів — кисню. Так, після еякуляції, спермі піддаються окисному тиску, який ще більше посилюється при підготовці до кріоконсервування (розрідженні, еквілібрації), заморожуванні і розморожуванні еякулятів [1]. Це зумовлено активуванням вільнорадикальних процесів: окисненням ліпідних і білкових компонентів плазми сперми та розріджувачів, а також перекисним окисненням ненасичених жирних кислот мембран статевих клітин. Вказані зміни призводять до зниження активності, виживання і запліднювальної здатності спермій [2, 3]. Проте, зростання окисних процесів і генерація АФК є необхідною умовою для прояву акросомної реакції та гіперактивного руху статевих клітин, запліднення ооцита [4]. На сьогоднішній день встановлено, що в спермі існує система антиоксидантного захисту, компоненти якої регулюють утворення та знищення цитотоксичних продуктів окиснення [5]. Одним із ключових ензимів, що регулює нагромадження активних форм Оксигену є супероксиддисмутаза [6, 7]. Доведено, що СОД забезпечує захист мембранних структур статевих клітин і, в цьому процесі, важливе значення мають її ізоформи. У зв'язку з цим вивчали у еякулятах бугаїв активність та спектр ізоформ протеїнів СОД і виживання спермій за інкубування сперми в атмосфері азоту та аерації.

Матеріали і методи. Досліджували еякуляти бугаїв, які отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. Для досліджень відбирали еякуляти об'ємом 2,5 – 4,0 мл, концентрацією $0,80 - 1,20 \times 10^9$ клітин/мл та активністю 7,5 – 8,0 бала спермій. Свіжоотриману сперму ділили на частини: контрольну (за природної атмосфери) та дослідні: дослід І — насичували (за об'ємом) ~ 5 мл азотом; дослід ІІ — аерували, пропускаючи через сперму, під тиском, ~ 5 мл атмосферного повітря. Проби

герметично закривали і зберігали 24 год. при температурі 0 – 4°C. В еякулятах визначали: активність [8] та вміст ізоформ СОД [9], загальний білок [10] і виживання сперміїв (год.) до припинення прямолінійного поступального руху. Статистичний аналіз результатів досліджень проведено за М. О. Плохінським [11].

Результати й обговорення. Встановлено, що дефіцит кисню (інкубування в атмосфері азоту), порівняно до контролю (природна атмосфера), призводить до зміни активності супероксиддисмутази і виживання сперміїв бугаїв. Так, за вказаних умов зменшуються на 13,7 % активність ензиму і на 16 год (15,4 %) виживання сперміїв (табл. 1).

Таблиця 1

Активність ензимів антиоксидантного захисту та виживання сперміїв за різної атмосфери інкубування еякулятів; $M \pm m$, $n = 9$

Активність ензимів	Контроль (природна атмосфера)	Дослід 1 (атмосфера азоту)	Дослід 2 (аерація)
СОД, МО/ мг протеїну	7,3 ± 0,5	6,3 ± 0,3	5,2 ± 0,3***
Вживання сперміїв, год	104 ± 10	88 ± 4	80 ± 9

Примітка: Різниця статистично вірогідна порівняно з контролем *** – $P < 0,001$

Більші відмінності виявлено за підвищеного вмісту кисню (аерації): знижуються на 2,1 МО/мг протеїну ($P < 0,001$) активність СОД і на 24 год (23,0 %) виживання сперміїв. Про вплив атмосфери інкубування сперми (доступність акцептора електронів) на активність ензиму й виживання сперміїв свідчить величина кореляційного відношення. Так, у спермі за анаеробних умов (атмосфера азоту) кореляційне відношення для СОД становить $\eta^2 = 0,65$, а для виживання сперміїв – $\eta^2 = 0,50$. За дії підвищеного вмісту кисню (аерації), порівняно з атмосферою азоту, зростає сила зв'язку для активності СОД ($\eta^2 = 0,91$) і виживання сперміїв — $\eta^2 = 0,59$.

Встановлено, що у спермі бугаїв активність СОД забезпечують п'ять ізоформ, які за швидкістю руху у 10 % поліакриламідному гелі позначили (від найменш - до максимально рухливої) S1, S2, S3, S4 та S5. При цьому, виявлені індивідуальні особливості ізоформ СОД в еякулятах бугаїв, які проявляються різною інтенсивністю смуг, що свідчить про їх неоднаковий внесок в сумарну активність ензиму.

При встановленні особливостей змін активності СОД за різної атмосфери інкубування сперми виявлено, що вміст S1 і S2-ізоформ знижується, відповідно, на 0,4 і 3,5 % ($P < 0,001$) за атмосфери азоту і на 15,5 ($P < 0,001$) та 3,1 % – аерації (табл. 2).

Таблиця 2

Вміст ізоформ СОД за різної атмосфери інкубування еякулятів, $M \pm m$; $n = 9$

Ізоформи СОД, %	Контроль	Дослід 1 (атмосфера азоту)	Дослід 2 (аерація)
S1	6,2 ± 0,3	5,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1***
S2	21,0 ± 1,7	5,5 ± 0,5***	17,9 ± 2,1
S3	5,5 ± 1,0	11,2 ± 2,3*	7,4 ± 1,2
S4	59,7 ± 5,8	63,9 ± 4,2	62,3 ± 4,1
S5	7,5 ± 2,3	13,7 ± 1,2*	9,7 ± 1,5

Примітка: Різниця статистично вірогідна порівняно з контролем * – $P < 0,05$; *** – $P < 0,001$

Протилежні результати отримані при аналізі вмісту S3, S4 та S5-ізоформ, величини значень яких зростають: за атмосфери азоту, відповідно, на 5,7 ($P < 0,05$), 4,2 і 6,2 % ($P < 0,05$) та за аерації — на 1,9, 2,6 і 2,2 %. Отже, незалежно від присутності акцептора електронів (атмосфери інкубування) у спермі бугаїв знижується вміст S1- і S2- та підвищується – S3-, S4- і S5-ізоформ СОД.

ВИСНОВКИ

1. Свіжоотримані еякуляти бугаїв характеризуються активністю СОД – $7,3 \pm 0,45$ МО/мг протеїну і виживанням сперміїв — $104 \pm 10,0$ год.

2. Аерування та інкубування в атмосфері азоту сперми знижують активність СОД, порівняно з контролем.

3. Тривалість виживання сперміїв зменшується при інкубуванні сперми як за умов аерування, так і за атмосфери азоту.

4. Умови інкубування сперми проявляють сильний вплив ($\eta^2 = 0,65 - 0,92$) на активність ензиму та середньої сили ($\eta^2 = 0,50 - 0,59$) на виживання сперміїв.

5. У спермі бугаїв активність СОД реалізується п'ятьма ізоформами — S1, S2, S3, S4 та S5. При цьому як за аерування, так й інкубування в атмосфері азоту знижується вміст S1- і S2- та підвищується — S3-, S4- і S5-ізоформ СОД.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно провести дослідження активності та вмісту ізоформ СОД сперми в процесах технологічної підготовки еякулятів до- і після розморожування.

ACTIVITY AND ISOFORM CONTENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND SPERMATOZOA SURVIVAL IN BULL EJACULATES AT DIFFERENT OXIDATIVE LOAD

N. V. Kuzmina, D. D. Ostapiv, I. M. Yaremchuk

Institute of animal biology of NAAS

S U M M A R Y

In freshly obtained and stored for 24 h. at 0 – 4°C temperature in nitrogen atmosphere and by aeration ejaculates activity and isoform content of superoxide dismutase (SOD) were studied. It is determined, that SOD activity in freshly obtained bull semen is $7,3 \pm 0,5$ UI/mg of protein and lowers on 13,7 % at nitrogen atmosphere incubation and on 28,8 % after aeration. Correlation between enzyme activity and storage conditions is, correspondingly, $\eta^2 = 0,65$ і $0,92$. It is set, that SOD activity is implemented by 5 isoforms that can be denoted, by movement in 10% PAAG, (from least to the most movable) S1, S2, S3, S4 and S5. With a deficit or excess of electron acceptor, comparing to control, we determined similar changes of electrophoretic movability of SOD isoforms. Content of S1 and S2 isoforms lowers, correspondingly, on 0,4 і 3,5 % ($P < 0,001$) at nitrogen atmosphere and on 15,5 ($P < 0,001$) і 3,1 % after aeration. Simultaneously content of S3, S4 and S5 isoforms increases: at nitrogen atmosphere on 5,7 ($P < 0,05$), 4,2 і 6,2 % ($P < 0,05$) and after aeration on 1,9, 2,6 і 2,2 %. Changes in SOD activity and isoform spectra are accompanied by lowering of spermatozoa survival: after aeration on 24 h. (23 %), and at incubation in nitrogen atmosphere on 16 h. (15 %), comparing to control.

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОФОРМ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ВЫЖИВАНИЕ СПЕРМИЕВ В ЭЯКУЛЯТАХ БЫКОВ ПРИ РАЗНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ НАГРУЗКЕ

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

Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

В свежеполученной и сохраненной 24 ч., при температуре 0 – 4°C в атмосфере азота) и при аэрации сперме быков исследовали активность и содержание изоформ супероксиддисмутазы (СОД). Установлено, что активность СОД в свежеполученной сперме быков составляет $7,3 \pm 0,5$ МО/мг протеина и снижается на 13,7 % при инкубировании в атмосфере азота и на 28,8 % при аэрации. При этом сила зависимости активности энзима от условий инкубирования составляет, соответственно, $\eta^2 = 0,65$ и $0,92$. Установлено, что активность СОД в сперме быков реализуется пятью изоформами, которые в зависимости от скорости движения в 10 % полиакриламидном геле обозначили (от наименее — до максимально подвижной) S1, S2, S3, S4 и S5. При дефиците или избытке акцептора электронов, по сравнению с контролем, выявлены похожие изменения электрофоретической подвижности изоформ СОД. Снижается содержание S1- и S2-изоформ, соответственно, на 0,4 и 3,5 % ($P < 0,001$) при инкубировании в атмосфере азота и на 15,5 ($P < 0,001$) и 3,1 % при аэрации. Одновременно содержание S3-, S4- и S5-изоформ повышается: в атмосфере азота, соответственно, на 5,7 ($P < 0,05$), 4,2 и 6,2 % ($P < 0,05$) и при аэрации — на 1,9, 2,6 и 2,2 %. Изменения активности и спектра изоформ СОД сопровождаются снижением продолжительности выживания спермиев: при аэрации — на 24 ч. (23 %), а при инкубировании в атмосфере азота — на 16 ч. (15 %), по сравнению с контролем.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Davies K. J.* Oxidative stress, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement systems / K. J. Davies // *IUBMB Life.* — 2000. — Vol. 50. — P. 279–289.
2. *Ferrusola O. C.* Effect of Cryopreservation on Nitric Oxide Production by Stallion Spermatozoa / O. C. Ferrusola, G. L. Fernandez, M. B. Garcia, C. Salazar-Sandoval, M. A. Rodriguez, R. H. Martinez, J. A. Tapia, F. J. Pena // *Biol. Reprod.* — 2009. — Vol. 81, N. 6. — P. 1106–1111.
3. *Awda B. J.* Reactive oxygen species and boar sperm function / B. J. Awda, M. Mackenzie-Bell, M. M. Buhr // *Biol. Reprod.* — 2009 — Vol. 81. — N.3 — P. 553–561.
4. *De Lamirande E.* Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa / E. De Lamirande, C. Gagnon // *Free Radical Biology and Medicine.* — 1995.— Vol. 18. — P. 487–495.
5. *Cadenas E.* Oxidative stress and formation excited species. Oxidative stress / E. Cadenas // H. Sies. Academic Press. — 1985. — P. 311–330.
6. *De Lamirande E.* Increased production of intra- and extracellular superoxide anion by capacitating human spermatozoa / E. De Lamirande, C. Gagnon // *J. of Andrology.*— 1995.— Vol. 1.— P. 54–59.
7. *De Lamirande E.* Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids / E. De Lamirande, D. Eiley, C. Gagnon // *International J. of Andrology.* —

1993.— Vol. 16. — P. 258–266.

8. *Чевари С. Н.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Н. Чевари, Т.А. Андян, Я. И. Штрэнгер // Лаб. дело. — 1991. — №10. — С. 9–13.

9. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [Влізло В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б. та ін.]; за ред. В. В. Влізло — Львів: Сполом, 2012. — 764 с.

10. *Lowry O. H.* Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Fair, R. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — № 1. — P. 264–275.

11. *Плохинский Н.А.* Биометрия. М.: МГУ, 1970. — С. 53–60.