

УДК 577.15:57.086.83:633.34.

Кузьміна Н.В., Остапів Д.Д., Яремчук І.М., Кушнірик Б.О.,
Корнят С.Б., Миколаїв О.О. ©

Інститут біології тварин НААН України, Львів

ІЗОФЕРМЕНТНИЙ СПЕКТР СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ СПЕРМИ БУГАЇВ І КНУРІВ

Вивчали ізоферментний спектр супероксиддисмутази (СОД) цільної сперми, плазми та сперміїв бугаїв і кнурів. Методом електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі і специфічним фарбуванням виявлено 5 смуг білків з СОД-активністю (S1 - S5). Встановлено, що ізоферментний спектр СОД характеризується видовою специфічністю: швидкістю міграції та інтенсивністю прояву ізоформ ферменту. У сперміях бугаїв і кнурів відсутні S1- та S2-смуги, на відміну від цільної сперми та плазми. Індивідуальні особливості сперми плідників проявляються різною інтенсивністю S1, S3 та S5-ізоформ СОД.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, ізоформи, сперма, електрофорез, видова специфічність.

Вступ. Генерація активних форм кисню (АФК) - необхідна умова для дозрівання, існування та здатності сперміїв запліднювати ооцит [1, 2]. Проте, після еякуляції і в процесі виживання надмірно високе утворення АФК призводить до пошкодження мембран, втрати рухливості та загибелі статевих клітин [3, 4]. Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується антиоксидантною системою, ключову роль в якій відіграє супероксиддисмутаза (СОД) [5]. Доведено, що СОД забезпечує захист структур статевих клітин і в цьому процесі важливе значення мають її ізоформи [5].

Оскільки фізіолого-біохімічна характеристика сперми та придатність до технологічної обробки залежить від виду самців, вивчали спектр та активність білків СОД у еякулятах бугаїв та кнурів.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв (n=12) та кнурів (n=7). Досліджували ізоформи СОД у цільній спермі, сперміях і плазмі. Для отримання сперміїв цільну сперму центрифугували при 3000 об./хв., плазму відбирали, а спермії тричі відмивали охолодженим 0,9% розчином NaCl. Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу у 10% поліакриламідному гелі (ПААГ). Готували пробі: для чого цільну сперму, плазму та спермії розбавляли 1:4 Трис-гліциновим буфером, рН 8,3; додавали 0,05 мл 40% сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл пробі (концентрація білка 50-100 мкг).

Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp і Fridovich [6] в нашій модифікації [7]: після електрофорезу ПААГ занурювали в розчин, що містив 1,23 мМ нітросинього тетразолію (НСТ)

в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, рН 7,8, на 15 хв. в темноті при кімнатній температурі і тричі промивали дистильованою водою. Потім заливали інкубаційним середовищем, що містило – 28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавін в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, рН 7,8. Інкубували в темноті протягом 20 хв. Після інкубації пластини промивали і опромінювали ультрафіолетом 7 хв. для генерації супероксиданіонрадикалів рибофлавіном. У результаті фотохімічної реакції відновлення НСТ до нітроформаза супероксидними аніонрадикалами пластини набували темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими внаслідок перехоплення супероксиданіонрадикалів супероксиддисмутазою.

Результати досліджень. Електрофорезом в 10 % ПААГ, у спермі бугаїв та кнурів виявлено п'ять ізоформ СОД, які за швидкістю руху у ПААГ позначили, від найменш - до максимально рухливої, як S1, S2, S3, S4 та S5 (Рис. 1).

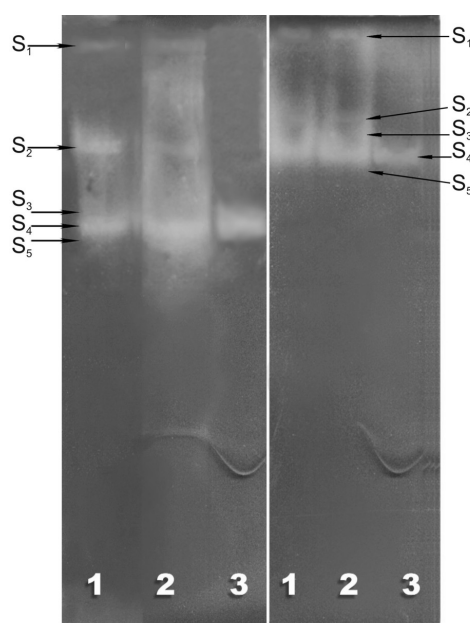


Рис. 1. Ізоферменти СОД сперми.
а) сперма бугая; б) сперма кнура.
1. цільна сперма; 2. плазма сперми;
3. спермії. S1 - S5 – ізоформи ферменту

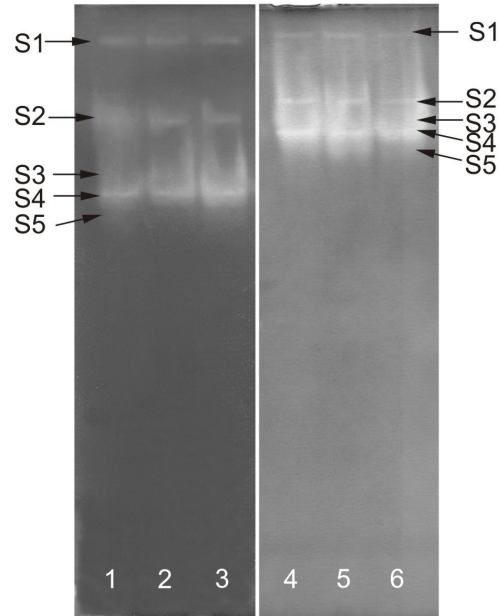


Рис. 2. Індивідуальні особливості ізоферментного складу СОД сперми плідників.
1-3 треки – сперма бугаїв; 4-6 треки – сперма кнурів.

Встановлено, що спектр ізоферментів СОД характеризується видовими відмінностями, які виражаються в різній швидкості міграції й інтенсивності прояву фракцій у ПААГ. Так, білки СОД сперми кнурів, порівняно з спермою бугаїв, мають меншу електрофоретичну рухливість. Для всіх отриманих

спектрів характерні слабкий прояв і мінорність S1-смуги, а також висока активність S4-смуги.

Індивідуальні особливості ізоформ СОД в еякулятах проявляються різною інтенсивністю S1, S3 та S5-смуг, що свідчить про їх неоднаковий внесок в сумарну активність ферменту (Рис. 2).

Встановлено, що у профілі ізоферментів СОД спермій як бугаїв, так і кнурів відсутні S1- і S2-смуги (Рис. 1, 3), а склад ферменту плазми і цільної сперми подібні між собою (Рис. 3).

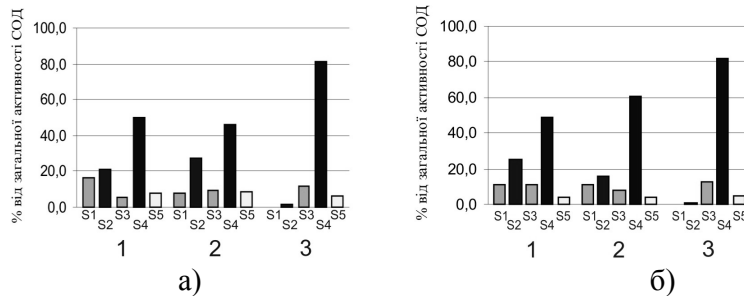


Рис. 3. Відсоток ізоформ у СОД-активності сперми.

а) сперма бугая; б) сперма кнура.

1 - цільна сперма; 2 - плазма сперми; 3 - спермії.

S1 - S5 – ізоформи ферменту.

Висновки:

1. В цільній спермі бугаїв і кнурів виявлено 5 ізоформ СОД.
2. Ізоферменти СОД кнурів і бугаїв відрізняються між собою за електрофоретичною рухливістю і інтенсивністю прояву окремих фракцій.
3. В спектрах білків СОД спермій, як бугаїв так і кнурів відсутні S1 та S2 смуги СОД-активності.
4. Індивідуальні особливості плідників за СОД-активністю проявляються різною інтенсивністю S1, S3, S5-смуг.

Література

1. P. Vernet, N. Analysis of Reactive Oxygen Species Generating Systems in Rat Epididymal Spermatozoa / Vernet P., Fulton N., Aitken R. J. // *Biology of Reproduction* — 2001. — Vol. 65. — P. 1102-1113.
2. Aitken R.J. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa / Aitken R.J, Ryan A.L, Baker M.A, McLaughlin E.A. // *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/ Ozgocmen S., Sogut S., Fadillioglu E., Ardicoglu A., Ardicoglu O. // *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 // *Journal of Andrology*, — 2007 — Vol. 28. — P. 41533-41545.

5. Potts R.J. Antioxidant capacity of the epididymis / Potts R.J., Jefferies T.M., Notarianni L.J. // Human Reproduction. — 1999 — Vol. 14. — P. 2513-2516.

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

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

Summary

**Kuz'mina N. V., Ostapiv D. D., Yaremchuk I. M., Kushnirik B. O.,
Kornyat S. B., Mykolayiv O. O.**

Institute of biology of animals UAAS, Lviv

ISOENZYME SPECTRUM OF SUPEROXIDE DISMUTASE OF BULLS' AND BOAR' SPERM

The isoenzyme spectrum of superoxide dismutase of thick sperm, plasma of bulls and boars' spermatozoa was studied. Using electrophoresis method in 10 % polyacrylamide gel with specific coloring 5 strips with superoxide dismutase activity (S1 - S5) were revealed. It was established that isoenzyme spectrum of superoxide dismutase is characterized by typical specific features: speed of migration and display of enzyme isoforms. In bulls and boar spermatozoa S1 and S2 strips are absent in contrast to the thick sperm and plasma. Individual characteristic features of sire sperm are displayed with different intensity S1, S3 and S5 isoforms of superoxide dismutase.

Стаття надійшла до редакції 4.03.2010