

УДК 636.2:577.15:612.616.

Кузьміна Н.В., пров.фахівець,
Остапів Д.Д., док. с/х наук, пров. наук. співробітник
Яремчук І.М., наук.співробітник ©
Інститут біології тварин НААН України, Львів

ІЗОФОРМИ АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В ЕЯКУЛЯТАХ БУГАЇВ

Досліджували ізоформи АСТ в еякулятах бугаїв у зв'язку з виживанням сперміїв. У спермії плідників виявлено дві ізоформи аспартатамінотрансферази (АСТ1 та АСТ2), які відрізняються між собою електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю зафарбування у 7,5% поліакриламідному гелі. Між часом виживання сперміїв та активністю аспартатамінотрансферази існує кореляція - сильна пряма з АСТ1 ($\eta^2_{АСТ1} = 0,88$) і обернена - з АСТ2 ($\eta^2_{АСТ2} = 0,87$). В процесі інкубування сперми співвідношення ізоформ АСТ змінюється – зростає вміст АСТ1 і знижується - АСТ2. Кореляційне відношення за часом виживання сперміїв при інкубуванні еякулятів для ізоформ ферменту становить, відповідно, до 100 год. - $\eta^2_{АСТ1} = 0,68$ і $\eta^2_{АСТ2} = 0,69$ і більше 100 год. - $\eta^2_{АСТ1} = 0,92$ і $\eta^2_{АСТ2} = 0,69$.

Ключові слова: аспартатамінотрансфераза, ізоформи, виживання сперміїв, сперма, електрофорез.

Вступ. Аспартатамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.1 L-аспартат : 2-оксоглутарат амінотрансфераза, АСТ; глутамат: оксалоацетат трансаміназа, ГОТ), фермент класу трансфераз, що каталізує за участю коферменту піридоксаль-5'-фосфату, обернене перенесення аміногрупи (трансамінування) від L-аспартату на α -кетоглутарат з утворенням оксалоацетату і L-глутамату. АСТ міститься в більшості тканин ссавців, є внутрішньоклітинним ферментом, складається переважно з двох субодиниць і існує у вигляді двох ізоформ – цитозольної (цАСТ, мол.в. ~ 92,6 тис.) і мітохондріальної (мАСТ, мол.м. ~ 89,8 тис.), які відрізняються між собою за фізико-хімічними властивостями. Близько 1/3 загальної внутрішньоклітинної активності АСТ локалізується в цитоплазмі клітин, 2/3 - в мітохондріях [1, 2]. АСТ виконує роль зв'язуючої ланки між білковим і енергетичним обмінами. Продукт її реакції глутамат – вихідна сполука катаболізму амінокислот; а оксалоацетат – один з головних регуляторних чинників, що визначає швидкість функціонування циклу трикарбонних кислот [3]. Ізоформи АСТ є компонентами малат-аспартаного шунту функціонуючого в клітках печінки, нирок та серця [4].

Визначення активності АСТ в сироватці або плазмі крові широко використовується в клінічній практиці для діагностики захворювань серця, печінки, крові, опорно-рухової системи та інших. При порушенні цілісності цитоплазматичної мембрани фермент виділяється з пошкоджених клітин в кров де його активність значно зростає. Для ензимодіагностики має велике значення

знання про субклітинну локалізацію ферменту. Так, поява в позаклітинній рідині цАСТ, свідчить про запальний процес, а при виявленні мітохондріальної фракції - про значні пошкодження тканин, наприклад, некроз.

Активність аспартатамінотрансферази проявляється у спермі плідників. Встановлено, що величина активності ферменту в еякулятах, поряд з іншими показниками, може служити маркером запліднювальної здатності спермій [5-8]. Тому метою роботи було вивчити ізоформи АСТ в еякулятах бугаїв у зв'язку з виживанням спермій.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв ($n = 22$), які належать НВО «Західплемресурси». У спермі свіжоотриманій та інкубованій при температурі $+2-4^{\circ}\text{C}$ (на першу, другу, третю та четверту доби) вивчали ізоформи білків АСТ (%) і виживання спермій (год.) до припинення прямолінійного поступального руху. Ізоформи АСТ виявляли після електрофорезу у 7,5% поліакріламідному гелі (ПААГ), для чого цільну сперму розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером і 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 АСТ здійснювали методом [9] в нашій модифікації: після електрофорезу пластини ПААГ занурювали у середовище, що містило 0,5 мг/мл піридоксаль-5-фосфату, 30 мг/мл альбуміну, 0,2 М L,D-аспарагінової кислоти, 0,1 М α -кетоглутарату та 150 мг діазолію синього С (міцного синього В) на 50 мл 0,2 М Na/K фосфатного буферу (рН 7,5) та інкубували 30 хв. при температурі 37°C . При інкубуванні гелю ізоформи аспартатамінотрансферази зафарбовуються в червоно-коричневий колір в наслідок наступних реакцій:

1. аспартат + α -кетоглутарат \leftrightarrow оксалоацетат + глутамат;
2. оксалоацетат + діазолій синій С \rightarrow зафарбований комплекс.

Після фарбування гелі фіксують в 7% розчині трихлороцтової кислоти протягом 20 хв., а потім відмивають залишки не зв'язаної фарби і зберігають в 7% розчині оцтової кислоти.

Результати досліджень. В досліджених еякулятах бугаїв виявлено дві ізоформи АСТ, які в залежності від електрофоретичної рухливості у 7,5 % ПААГ позначили як АСТ1 (менш рухлива) та АСТ2 (більш рухлива; рис. 1).

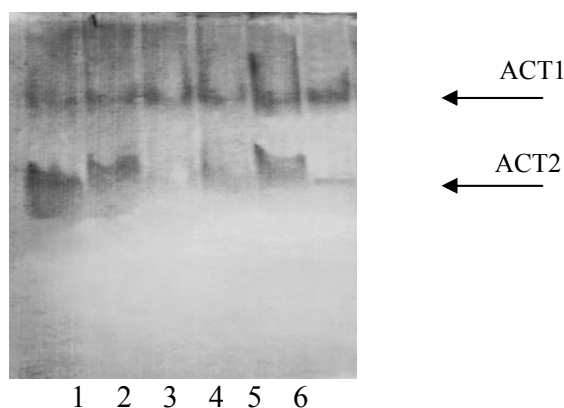


Рис. 1. Білки АСТ сперми бугаїв (АСТ1 і АСТ2 - ізоформи АСТ; 1 - 6 треки - свіжоотримана сперма бугаїв).

Як видно з рис. 1 ізоформи АСТ відрізняються як за швидкістю руху в процесі електрофоретичного розділення білків, так і за інтенсивністю прояву та площею зафарбованих смуг ізоформ ферменту.

Встановлена відмінність свідчить про неоднакову активність ізоформ ферменту у еякулятах бугаїв, що, відповідно, вказує на якість статевих клітин. Так, для сперми бугаїв з часом виживання сперміїв менше 100 та більше 100 год. характерний різний вміст ізоформ АСТ (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст ізоформ АСТ (%) свіжоотриманої сперми бугаїв та виживання сперміїв

Ізоформи АСТ	Вживання, год.		
	<100 n=8	100-144 n=9	>144 n=5
АСТ1	37,6±1,45	64,4±2,03***	68,5±1,80***
АСТ2	62,4±1,80	35,6±2,14***	31,5±1,79***

Примітка: *** - $p < 0,001$ різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальною величиною.

У свіжоотриманих еякулятах з величиною фізіологічного показника більше 100 год. вміст АСТ1-ізоформи вищий на 26,8 - 30,9% ($p < 0,001$), ніж при виживанні сперміїв менше 100 год (37,6±1,45%), а вміст АСТ2-ізоформи, навпаки, нижчий. Аналіз кореляції свідчить, що між ізоформами АСТ та тривалістю виживання статевих клітин існує сильна залежність: для АСТ1 – пряма, а для АСТ2 – обернена. Кореляційне відношення за виживанням сперміїв для ізоформ становить: $\eta^2_{АСТ1} = 0,88$ та $\eta^2_{АСТ2} = 0,87$. Таким чином, співвідношення ізоформ ферменту у свіжоотриманих еякулятах бугаїв є показником тривалості виживання сперміїв.

В процесі інкубування сперми співвідношення ізоформ АСТ змінюється. В еякулятах з величиною фізіологічного показника менше 100 год. на другу добу інкубування, в порівнянні з першою, зростає вміст АСТ1-ізоформи на 16,8 %, досягаючи свого максимуму на третю (61,43±2,41%, $p < 0,001$), а вміст АСТ2-ізоформи, відповідно, знижується з 65,5±1,20% (перша доба) до 39,0±2,70% (третя доба; рис. 1).

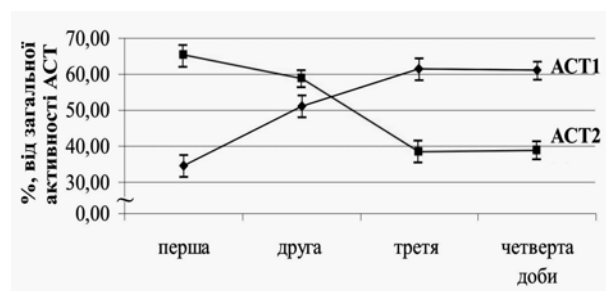


Рис. 1. Вміст ізоформ АСТ при інкубуванні у еякулятах з виживання сперміїв менше 100 год.

При тривалості виживання сперміїв більше 100 год. вміст АСТ1-ізоформи зменшується на другу добу - на 12,9%, на третю повертається до вихідної

величини ($65,0 \pm 1,52\%$) і на четверту збільшується на 5,8%, порівняно з першою добою (рис. 2). Отже, з вищою величиною фізіологічного показника

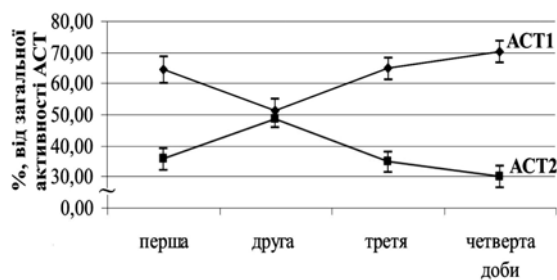


Рис. 2. Вміст ізоформ АСТ при інкубуванні у еякулятах з виживання спермій більше 100 год.

співвідношення ізоформ АСТ змінюється у спермі меншою мірою ($p < 0,05$), порівняно з низьким часом виживання спермій ($p < 0,001$). Із аналізу кореляції випливає, що між часом інкубування сперми та вмістом ізоформ АСТ існує сильна залежність: для АСТ1 – пряма, а для АСТ2 – обернена. Кореляційне відношення за часом інкубування для ізоформ ферменту становить, відповідно, до 100 год. - $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,68$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$ і більше 100 год. - $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,92$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$.

Таким чином, при збільшенні часу інкубування еякулятів відбуваються зміни активності АСТ-ізоформ, які можуть свідчити про оптимізацію забезпечення енергією статевих клітин в процесі виживання, а співвідношення ізоформ ферменту у свіжоотриманій спермі служить критерієм життєздатності спермій.

Висновки.

1. В спермі бугаїв виявлено дві ізоформи АСТ, які відрізняються між собою за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю зафарбування у ПААГ.

2. Встановлена кореляція з часом виживання спермій - сильна пряма для АСТ1 ($\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,88$) та обернена - для АСТ2 ($\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,87$) ізоформ.

3. В процесі інкубування сперми співвідношення ізоформ АСТ змінюється. Кореляційне відношення за часом інкубування еякулятів для ізоформ ферменту становить, відповідно, до 100 год. - $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,68$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$ і більше 100 год. - $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,92$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$.

Література.

1. Биохимия. /Под ред. Е.С. Северина. — Москва: Мир. — 2003. — С. 119-124.

2. Leung F.Y. Isolation and purification of aspartate aminotransferase isoenzymes from human liver by chromatography and isoelectric focusing / Leung F.Y., Henderson A.R. //Clin. Chem. — 1981. — Vol.27. — N2. — P. 232-235.

3. Córdoba M. Heparin and quercetin generate differential metabolic pathways that involve aminotransferases and LDH-X dehydrogenase in cryopreserved bovine spermatozoa / Córdoba M., Pintos L.N., Beconi M.T. //Theriogenology. — 2007 — Vol. 67 — P. 648-654.

4. Mitchell M. Disruption of Mitochondrial Malate-Aspartate Shuttle Activity in Mouse Blastocysts Impairs Viability and Fetal Growth / Mitchell M., Cashman K. S., Gardner D., Thompson J., Lane M. // *Biology of Reproduction*. — 2009. — Vol. 80. — N. 2. — P. 295-301.

5. Nizański W. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing / Nizański W., Dubiel A., Bielas W., Dejneka G.J. // *Reprod. Fertil. Suppl.* — 2001. — Vol. 57. — P. 365-369.

6. Gaczarzewicz D. Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods. / Gaczarzewicz D., Piasecka M., Udała J., Błaszczak B., Stankiewicz T., Laszczyńska M. // *Acta Vet. Hung.* — 2010. — Vol. 58. — N. 1. — P. 105-116.

7. Gündoğan M., Yeni D., Uçar M., Ozenç E. Relationship between some reproductive parameters and biochemical properties of blood serum in rams. / Gündoğan M., Yeni D., Uçar M., Ozenç E. // *Arch. Androl.* — 2004. — Vol. 50. — N. 6. — P. 387-390.

8. Kozdrowski R., Dubiel A. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. / Kozdrowski R., Dubiel A. // *Anim. Reprod. Sci.* — 2004. — Vol. 80. — N. 3-4. — P. 281-289.

9. Alfano J. Isolation and characterization of a gene coding for a novel aspartate aminotransferase from rhizobium meliloti / Alfano J., Kahn M. // *Journal of Bacteriology* — 1993. — Vol. 175. — P. 4186-4196.

Summary

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

Institute of animal biology NAAS of Ukraine

ISOFORMS OF ASPARTATEAMINOTRANSFERASE IN BULL'S EJACULATES

The isoforms of AST in bull's ejaculates in connection with survival of spermatozoa were studied. In sperm of bulls – sires were found two isoforms of aspartateaminotransferase (AST1 and AST2) that differ by their electroforetical mobility, and intensity of colouring in 7,5% polyacrylamide gel. Between time of survival of spermatozoa and activity of aspartateaminotransferase exists strong direct correlation for AST1 ($\eta^2_{AST1} = 0,88$), and inverse – for AST2 ($\eta^2_{AST2} = 0,87$). During the incubation of sperm correspondence of isoforms of AST changes: increases the content of AST1 and decreases AST2. Correlation ratio between time of incubation of ejaculates and isoforms of enzyme, to 100 hours, is: - $\eta^2_{ACT1} = 0,68$ i $\eta^2_{ACT2} = 0,69$, and more than 100 hours: $\eta^2_{AST1} = 0,92$ i $\eta^2_{AST2} = 0,69$.

Стаття надійшла до редакції 3.09.2010