

УДК 577.151.64:591.463.1

НАСЄДКІНА Н.В., аспірантка

Науковий керівник – ОСТАПІВ Д.Д., д-р с.-г. наук

Інститут біології тварин НААН України

samd@inenbiol.com.ua**АКТИВНІСТЬ ТА ІЗОФОРМИ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ
ЗА ІНКУБУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ**

У статті наведено показники вивчення вмісту загального білка, активності та ізоформи ацетилхолінестерази (АХЕ) за інкубування сперми бугаїв. Встановлено, що за інкубування еякулятів упродовж 48 год за 2–4 °С знижується вміст загального білка ($p < 0,05-0,01$) і активність ацетилхолінестерази (АХЕ) в цільній спермі, плазмі і сперміях ($p < 0,05$). За вказаних умов зменшується кількість ізоформ АХЕ в розділяючому 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ), знижується інтенсивність їх зафарбування і виявляються активні протеїни ензиму в концентруючому гелі (3,5 % ПААГ). Особливістю інкубованої сперми, порівняно зі свіжоотриманою, є присутність АХЕ0-ізоформи та відсутність АХЕ8 – у всіх досліджених зразках і АХЕ3 – у сперміях. Зміни вмісту ізоформ за інкубування протягом 48 год за 2–4 °С, порівняно зі свіжоотриманими еякулятами, характеризуються зростанням АХЕ1, АХЕ4 і АХЕ5 (майже 70,0 % від загального вмісту ізоформ) в цільній спермі, АХЕ4 і АХЕ5 (майже 50,0 %) – у плазмі, АХЕ0 і АХЕ1 (40,9 %) – у сперміях.

Ключові слова: ацетилхолінестераза, ізоформи, сперма, бугаї.

Постановка проблеми. Прямолінійний поступальний рух сперміїв зумовлений здатністю статевих клітин засвоювати субстрати плазми сперми і ресинтезувати АТФ. Вказані можливості сперміїв забезпечуються сполуками та ензимами, які не тільки перетворюють, але й регулюють використання субстратів. До таких належать ацетилхолін і ацетилхолінестераза (АХЕ). Активність ензиму і ацетилхолін виявлені в спермі самців. Доведено, що ацетилхолін і АХЕ впливають на рухливість та стимулюють акросомну реакцію статевих клітин [1, 2]. Так, вища активність ацетилхолінестерази у плазмі сперми, ніж сперміях, зумовлена участю ацетилхолін-ацетилхолінестеразної системи в забезпеченні рухливості статевих клітин. Вивченням локалізації ацетилхолінестерази у сперміях встановлено, що у хвостиках активність ензиму у 5 разів вища, ніж у голівках сперміїв. Дослідженням ацетилхолінестерази у спермі бугаїв виявлено значні індивідуальні особливості активності ензиму. Крім того, встановлено породні і сезонні особливості активності холінестерази в еякулятах: у бугаїв – ензим активніший взимку, у жеребців – влітку.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У спермі бугаїв активність АХЕ забезпечують її ізоформи, кількість яких залежить від фізіологічного стану організму та індивідуальних особливостей плідників. Залежно від умов досліджень встановлено від 3 до 11 активних ізоформ ензиму [3, 4]. Зокрема, за використання однорідного 10 % поліакриламідного гелю виявлено три ізоформи холінестерази, тоді як у градієнтному (4,5 і 8,0 %) – до 11 ізоформ.

За існування сперміїв змінюється метаболізм, зростає використання субстратів і ресинтез АТФ, активуються процеси вільнорадикального окиснення [5]. Очевидно змінюється й активність систем, які регулюють утворення і використання енергії, у тому числі й АХЕ.

Мета дослідження – вивчити активність та ізоформи АХЕ за інкубування сперми бугая.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проведені в Інституті біології тварин НААН та Львівському науково-виробничому центрі "Західплемресурси". Сперму бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання – дуплетна садка два рази на тиждень, через дві–три доби. Еякуляти, попередньо оцінені за фізіологічними показниками (об'ємом, концентрацією і кількістю живих сперміїв), ділили на дві частини: одну досліджували після отримання (свіжоотримана сперма), а іншу інкубували 48 год за 2–4 °С. Свіжоотриману сперму розділяли на частини – одну залишали (цільна сперма), а іншу центрифугували за 4000 об/хв упродовж 10 хв. Плазму сперми відбирали, а спермії промивали 0,9 % NaCl і знову центрифугували за тих же умов. Надосадову рідину відбирали, а осад сперміїв ресуспензували в адекватному до відібраного об'єму плазми сперми 0,9 % NaCl. Аналогічні процедури проведені зі спермою, інкубованою 48 год за 2–4 °С. У зразках цільної плазми і суспензії сперміїв, свіжоотриманої та інкубованої сперми досліджували вміст загального білка (мг/мл) [6, 7], активність АХЕ – за швидкістю гідролізу ацетилхоліну (нмоль/хв×мг протеїну) [8].

Для виявлення ізоформ АХЕ проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Проби для електрофорезу готували: цільну сперму розбавляли 1:3 0,005 М Трис-гліциновим буфером (рН 8,5), а плазму і суспензію сперміїв не розбавляли. До зразків додавали 0,05 мл 40 % сахарози і вносили 0,04 мл проби у лунки концентруючого гелю (3,5 % ПААГ). Після

електрофорезу виявляли ізоформи АХЕ [9]. Копії фореграм отримували прямим скануванням ПААГ. Відносний вміст ізоформ (у процентах) вираховували з використанням програмного забезпечення *Soft Spectr* 1.3. Ізоформи нумерували залежно від швидкості міграції у ПААГ – від найменш до найбільш рухливої. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М.О. Плохінським [10]. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Результати дослідження та їх обговорення. Свіжоотримана сперма бугаїв містить $51,7 \pm 3,52$ мг/мл білка і характеризується активністю АХЕ $48,3 \pm 8,72$ нмоль/хв×мг білка (табл. 1).

У плазмі сперми вміст загального білка і активність ензиму становлять відповідно $32,3 \pm 0,82$ мг/мл білка і $33,7 \pm 5,50$ нмоль/хв×мг білка, що вище, ніж у сперміях, на 44,2 % ($p < 0,01$) і 80,2 % ($p < 0,05$). В інкубованій упродовж 48 год спермі, порівняно зі свіжоотриманою, нижчі величини вмісту загального білка на 23,2 % ($p < 0,05$) в цільній, 17,9 % ($p < 0,01$) – плазмі і на 41,5 % ($p < 0,05$) – у сперміях, а активність АХЕ відповідно на 17,9; 13,0 та 41,2 % ($p < 0,05$).

Таблиця 1 – Вміст загального білка і активність АХЕ в еякулятах бугаїв, $n=3$; $M \pm m$

Досліджувані показники	Цільна сперма	Плазма сперми	Спермії
	Свіжоотримана		
Вміст загального білка, мг /мл	$51,7 \pm 3,52$	$32,3 \pm 0,82^{**}$	$22,4 \pm 2,52$
Активність АХЕ, нмоль/хв×мг білка протеїну	$48,3 \pm 8,72$	$33,7 \pm 5,50^*$	$18,7 \pm 2,76$
	Інкубована 48 год		
Вміст загального білка, мг /мл	$39,7 \pm 1,12^\#$	$26,5 \pm 0,95^{\#\#}$	$13,1 \pm 1,49^\#$
Активність АХЕ, нмоль/хв×мг білка протеїну	$39,7 \pm 6,47$	$29,3 \pm 1,06$	$11,0 \pm 1,25^\#$

Примітки: різниця статистично вірогідна – * порівняно до мінімального значення – $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $^\#$ порівняно до свіжоотриманої сперми – $^\# p < 0,05$; $^{\#\#} p < 0,01$.

Таким чином, інкубування еякулятів бугая призводить до зниження вмісту загального білка і активності АХЕ як у цільній спермі, так і її компонентах – плазмі та сперміях.

Аналіз спектра АХЕ свіжоотриманої сперми, сперміїв і плазми свідчить про неоднакову кількість ізоформ ензиму, їх різну рухливість в електричному полі та інтенсивність зафарбування (рис. 1). Крім того, візуальним оцінюванням фореграм виявлено, що основна кількість й інтенсивність зафарбування ізоформ ензиму знаходяться в плазмі сперми і менше – в сперміях. Для свіжоотриманих еякулятів бугаїв характерні 5–6 основних ізоформ АХЕ і 3–4 мінорних.

Інкубування сперми призводить до зменшення кількості ізоформ в розділяючому 7,5 % ПААГ, зниження інтенсивності їх зафарбування і прояву активних протеїнів ензиму в концентруючому гелі (3,5 % ПААГ; рис. 2).

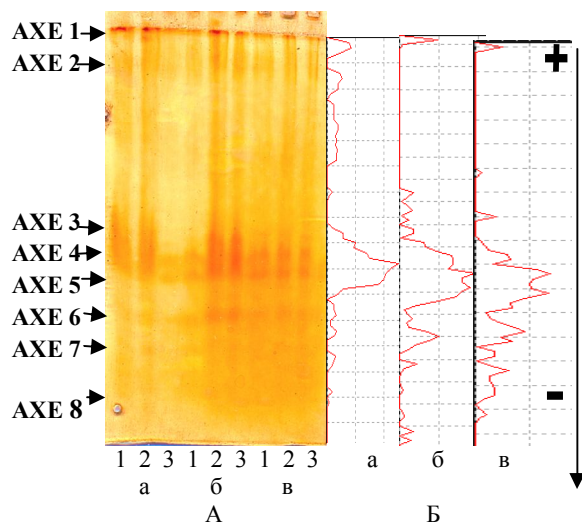


Рисунок 1 – Ізоформи АХЕ свіжоотриманої сперми бугая: А – копія фореграм; Б – денситограми: а – цільна сперма; б – плазма; в – спермії; 1–3 еякуляти різних бугаїв; АХЕ 1 – АХЕ 8 – ізоформи ензиму.

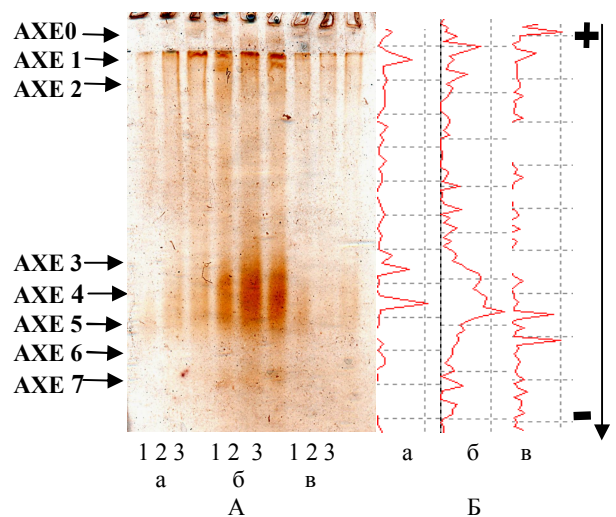


Рисунок 2 – Ізоформи АХЕ інкубованої сперми бугая: А – копія фореграм; Б – денситограми: а – цільна сперма; б – плазма; в – спермії; 1–3 еякуляти різних бугаїв; АХЕ 0–АХЕ 7 – ізоформи ензиму.

Вивченням відносного вмісту ізоформ свіжоотриманих еякулятів встановлено, що у цільній спермі майже 27,4 % припадає на АХЕ1. Вміст АХЕ2 і АХЕ3 нижчий, порівняно з АХЕ1, відповідно на 12,4 і 14,9 %, АХЕ4, АХЕ6 і АХЕ7 – 17,9–20,2 % і АХЕ5 – на 23,1 % (табл. 2). Найменша різниця між вмістом АХЕ1 і АХЕ8 – 10,6 %. На відміну від цільної сперми, у плазмі і сперміях найбільше АХЕ4 відповідно 34,1±9,78 і 29,3±1,89 %. У плазмі сперми однаковий вміст (5,0–6,4 %) АХЕ1, АХЕ2 і АХЕ7, вищий (10,0–11,3 %) – АХЕ5, АХЕ6 і АХЕ8 і ще більший (17,7 %) – АХЕ3. У сперміях, подібно до плазми, найменше АХЕ1 (1,9±0,58 %), більше – АХЕ6 і АХЕ7 (6,6–7,3 %), ще більше – АХЕ3, АХЕ5 і АХЕ8 (16,2–18,0 %).

В інкубованій спермі вміст ізоформ відрізняється від свіжоотриманої. Так, майже 1/3 вмісту займає АХЕ1 (28,5±7,66 %), 40,9 % – дві ізоформи АХЕ4 і АХЕ5 (18,7±4,95 і 22,2±7,42 %), менше (4,6–8,0 %) припадає на АХЕ2, АХЕ3 і АХЕ6, а найменше (3,2±0,36 %) – АХЕ7. Особливістю інкубованої сперми є присутність АХЕ0 (6,9±1,06 %). На відміну від цільної сперми, у плазмі, від загального вмісту ізоформ, 46,7 % займають дві ізоформи – АХЕ4 і АХЕ5 (відповідно 21,1±4,43 та 25,6±5,16 %), АХЕ1 – 18,8±6,54 %, а АХЕ2 і АХЕ6 – 4,8±1,16 і 4,03±0,41 %. У сперміях на АХЕ0 і АХЕ1 припадає 40,9 % (16,0±1,26 та 24,9±2,05 %), менше (16,0–18,6 %) – на АХЕ2, АХЕ4 і АХЕ5, найменше – АХЕ6 (6,6±0,72 %). Особливістю спектра ізоформ АХЕ спермій є відсутність АХЕ3.

Таблиця 2 – Вміст ізоформ АХЕ за інкубування еякулятів бугаїв, %; n=3; M±m

Ізоформи АХЕ та їх номер	Свіжоотримана сперма			Інкубована сперма 48 год		
	цільна	плазма	спермії	цільна	плазма	спермії
0	-	-	-	6,9±1,06	5,9±1,25	16,0±1,26
1	27,4±8,44	6,4±2,47	1,9±0,58	28,5±7,66	18,8±6,54	24,9±2,05
2	15,0±2,48	5,0±1,61	3,1±1,69	8,0±0,94	4,8±1,16	17,6±5,05
3	12,5±5,61	17,7±1,36	17,6±2,03	8,0±0,50	11,1±1,54	0
4	7,3±2,38	34,1±9,78	29,3±1,89	18,7±4,95	21,1±4,43	16,6±3,25
5	4,3±1,97	10,3±6,32	18,0±1,27	22,2±7,42	25,6±5,16	18,6±3,22
6	9,5±2,47	11,1±3,06	7,3±0,73	4,6±0,31	4,03±0,41	6,6±0,72
7	7,2±0,95	5,4±1,97	6,6±0,90	3,2±0,36	8,6±1,75	0
8	16,8±2,80	10,0±1,83	16,2±1,20	-	-	-

Таким чином, за інкубування еякулятів знижується вміст загального білка, активність АХЕ, змінюються відношення між активними протеїнами ензиму. Причиною зниження вмісту загального білка є, ймовірно, зменшення субстратів у плазмі сперми за інкубування, що зумовлює використання сперміями альтернативних джерел енергії, зокрема, розщеплення протеїнів і утилізація амінокислот як джерело ресинтезу АТФ [5, 11]. Зниження активності АХЕ, зменшення інтенсивності зафарбування треків ізоформ ензиму в інкубованій спермі як цільній, так і сперміях, свідчить про виснаження системи ацетилхолін-ацетилхолінестераза і зниження холінергічних процесів. Висновок впливає з результатів досліджень сперми кролів за інкубування, якими виявлено зниження (втрату) вмісту медіатора (ацетилхоліну) [12]. Виявлені особливості змін спектра ізоформ АХЕ, поява АХЕ0-ізоформи в інкубованій спермі узгоджується зі змінами, які відбуваються в спермі і структурах мембран спермій за інкубування. На фоні вичерпання енергетичних субстратів, у статевих клітинах зростає окиснення ненасичених жирних кислот ліпідів мембран, втрачається холестерол і мембранозв'язані ензими [5]. Через руйнування структур мембран спермії втрачають рухливість і гинуть. Ймовірно, АХЕ0 є мембранозв'язана високомолекулярна ізоформа ензиму, яка виявляється тільки за руйнування спермій. Іншим можливим механізмом, який забезпечує утворення АХЕ0, може бути спонтанна капацитація і синтез та вивільнення ацетилхоліну із постакросомальної ділянки. У сперміях виявлений ензим, необхідний для утворення ацетилхоліну – холінацетилтрансфераза [13, 14, 15], що може призводити до активування АХЕ0.

Висновки. 1. Інкубування сперми протягом 48 год за 2–4 °С знижує вміст загального білка ($p < 0,05-0,01$) і активність АХЕ в цільній спермі та її складових – плазмі і сперміях ($p < 0,05$).

2. В еякулятах, плазмі і сперміях за інкубування зменшується кількість ізоформ в розділяючому 7,5 % ПААГ, знижується інтенсивність їх зафарбування і виявляються активні протеїни ензиму в концентруючому гелі (3,5 % ПААГ).

3. Особливістю інкубованої сперми, порівняно зі свіжоотриманою, є присутність АХЕ0 та відсутність АХЕ8 у всіх досліджених зразках і АХЕ3 – у сперміях.

4. За інкубування протягом 48 год за 2–4 °С зростає вміст АХЕ1, АХЕ4 і АХЕ5 (майже 70,0 % від загального вмісту ізоформ) у цільній спермі, АХЕ4 і АХЕ5 (40,9 %) – плазмі, АХЕ0 і АХЕ1 (40,9 %) – у сперміях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nelson L. Sperm motility in "Fertilization"/L. Nelson, C. B. Metz, A. Monroy // Academic Press: New York, 1967. – Vol. 1. – P. 27–97.
2. Репродуктивна функція і андрологічна диспансеризація бугаїв / М.В. Косенко, Б.М. Чухрій, І.Я. Коцюмбас [та ін.]. – Львів, 2007. – 186 с.
3. Meizel S. Electrophoretic studies of esterases of bull spermatozoa, cytoplasmic droplets and seminal plasma / S. Meizel, O. Boggs, J. Cotham // The journal of histochemistry and cytochemistry. – 1971. – Vol. 19, № 4. – P. 226–231.
4. Наседкіна Н.В. Ізоформи холінестерази у спермі та репродуктивних органах бугаїв / Н.В. Наседкіна, Н.В. Кузьміна, Д.Д. Остапів // Біологія тварин. – Львів, 2012. – Т.14, № 1–2. – С. 169–173.
5. Наук В.А. Структурно-функциональные особенности сперматозоидов сельскохозяйственных животных при криоконсервации и разработка эффективных способов их длительного хранения: автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра биол. наук: спец. 03.00.04 – Биохимия / В.А. Наук – Харьков, 1987. – 32 с.
6. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін.]; за ред. В.В. Влізла. – Львів: СПОЛІОМ, 2012. – 764 с.
7. 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. 265–275.
8. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии: справочник / А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2002. – С. 45–46.
9. Maynard E.A. Electrophoretic studies of cholinesterases in brain and muscle of the developing chicken / E.A. Maynard // J. Exp. Zool. – 1966. – Vol. 161. – P. 319–336.
10. Плохинский Н. А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – Москва: МГУ, 1970. – 358 с.
11. Cordoba M. Heparin and quercetin generate differential metabolic pathways that inVve aminotransferases and LDH-X dehydrogenase in cryopreserved bovine spermatozoa. / M. Cordoba, L.N. Pintos, M.T. Beconi // Theriogenology. – 2007. – Vol. 67, № 3. – P. 648–654.
12. Сайко А. А. Физиологическая роль ацетилхолина в сперме животных / А.А. Сайко // Сельскохозяйственная биология. – 1969. – Т.4, № 5. – С. 759–765.
13. Stewart T.A. Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in ram spermatozoa / T.A. Stewart, I.T. Forrester // Biol. Reprod. – 1978. – Vol. 19. – P. 271–279.
14. Expression of choline acetyltransferase mRNA in spermatogenic cells results in an accumulation of the enzyme in the postacrosomal region of mature spermatozoa / [C.F. Ibanez, M. Peltto-Huikko, O. Soder et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1991. – Vol. 88. – P. 3676–3680.
15. Bray C. Nicotinic Acetylcholine Receptor Is Involved in the Acrosome Reaction of Human Sperm Initiated by Recombinant Human ZP3 / C. Bray, Jung-Ho Son, S. A. Meizel // Biology of Reproduction. – 2002. – Vol. 67, № 3. – P. 782–788.

Активность и изоформы ацетилхолинэстеразы при инкубировании спермы быков

Н.В. Наседкина

В статье отображены результаты изучения содержания общего белка, активности и изоформы ацетилхолинэстеразы (АХЭ) при инкубации спермы. Установлено, что при инкубировании эякулятов 48 ч при 2–4 °С снижается содержание общего белка ($p < 0,05-0,01$) и активность АХЭ в цельной сперме, плазме и спермиях ($p < 0,05$). При указанных условиях уменьшается число изоформ АХЭ в разделяющем 7,5 % ПААГ, снижается интенсивность их окраски и проявляются активные протеины энзима в концентрирующем геле (3,5 % ПААГ). Особенностью инкубированной спермы, по сравнению со свежеполученной, является присутствие АХЕ0-изоформы и отсутствие АХЕ8 – во всех исследованных образцах и АХЕ3 – в спермиях. Изменения содержания изоформ в инкубированных 48 ч при 2–4 °С, по сравнению со свежеполученными эякулятами, характеризуются увеличением АХЕ1, АХЕ4 и АХЕ5 (почти 70,0 % от общего содержания изоформ) в цельной сперме, АХЕ4 и АХЕ5 (почти 50,0 %) – плазме, АХЕ0 и АХЕ1 (40,9 %) – спермиях.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, изоформы, сперма, быки.