

Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д., Яремчук І. М., Корнят С. Б., Горчин С. В.
Інститут біології тварин НААН

АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ, ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ ТА ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ У ЕЯКУЛЯТАХ КНУРІВ

Рецензент – кандидат біологічних наук А.В. Базалевич

Встановлено, що свіжоотримані еякуляти кнурів характеризуються активністю каталази (КАТ) – $0,22 \pm 0,05$ мкмоль/хв \times мг протеїну, дихальною активністю – $4,7 \pm 0,2$ нг-атом О/(хв \times 0,1 мл сперми), виживанням сперміїв – 116 ± 22 год. Активність ензиму впливає на інтенсивність споживання кисню спермою та виживання сперміїв. За активності КАТ менше $0,20$ мкмоль/хв \times мг протеїну інтенсивність дихання сперми кнурів найвища – $6,2 \pm 0,91$ нг-атом О/(хв \times 0,1 мл сперми) і зменшується на $40 - 44$ % ($P < 0,05$) за більше $0,20$ мкмоль/хв \times мг протеїну. Кореляція між активністю ензиму та споживанням кисню негативна середньої сили ($\eta = 0,688$). В еякулятах кнурів зв'язок між активністю КАТ та інтенсивністю споживання кисню спермою за дії фториду натрію слабкий ($\eta = 0,240$), в присутності аміталу і натрію азиду середньої сили, відповідно, криволінійний ($\eta = 0,391$) і негативний ($\eta = 0,653$). За дії Na_2EDTA зв'язок між дослідженими показниками негативний середньої сили ($\eta = 0,661$). Встановлений сильний позитивний зв'язок між активністю КАТ та виживанням сперміїв кнурів ($\eta = 0,711$) може бути використаний для оцінювання фізіологічних характеристик статевих клітин.

Ключові слова: активність каталази, інтенсивність дихання, інгібітори, виживання сперміїв, сперма, кнури.

Вступ. Генерація активних форм Оксигену ($\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^- , H_2O_2 ; АФО) є необхідною умовою для дозрівання, існування та здатності сперміїв запліднювати ооцит [1, 2]. Зокрема встановлено, що в дихальному ланцюзі мітохондрій статевих клітин при одноелектронному відновленні молекулярного кисню утворюється супероксиданіон радикал, який за участі супероксиддисмутази перетворюється в Гідроген пероксид. Доведено, що H_2O_2 разом з іншими чинниками бере участь в збільшенні концентрації внутрішньоклітинного цАМР, необхідного для запуску каскаду реакцій фосфорилування тирозину і капацитації сперміїв [3]. Проте, надмірно висока інтенсивність утворення АФО, в тому числі й Гідроген пероксиду, призводить до пошкодження мембран, втрати рухливості та загибелі статевих клітин. Основним ензимом, що регулює не фізіологічно високі концентрації H_2O_2 і підтримує його вміст на оптимальному рівні є каталаза (КАТ) [4].

Метою роботи було вивчити зв'язки активності каталази з інтенсивністю споживання кисню спермою та виживанням сперміїв кнурів.

Матеріали та методи досліджень. Досліджували еякуляти кнурів ($n = 18$), які отримували мануальним методом з режимом використання – садка два рази на тиждень. Для досліджень відібрані свіжоотримані еякуляти об'ємом $105,1 \pm 30,2$ мл та концентрацією сперміїв $370,5 \pm 43,5 \times 10^6$ клітин/мл. У спермі визначали активність КАТ (мкмоль/хв \times мг протеїну) [5], концентрацію протеїну (мг/мл) [6], виживання сперміїв (год.) при температурі $2-4^\circ\text{C}$ до припинення прямолінійного поступального руху, споживання кисню – полярографічно (нг-атом О/хв \times 0,1 мл сперми) за температури $38,5^\circ\text{C}$. Оскільки, ресинтез АТР сперміями здійснюється гліколізом і диханням, для встановлення частки кисню, що споживається статевими клітинами у вказаних процесах використовували інгібітори: аеробного гліколізу – натрію фторид (NaF ; 10^{-3}M),

NAD-залежної ланки ланцюга транспорту електронів – амітал ($5 \times 10^{-3} \text{M}$) і термінальної (цитохромоксидази) – натрію азид (NaN_3 ; $5 \times 10^{-2} \text{M}$). Для виявлення частки спожитого Оксигену в процесі вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот застосовували Na_2EDTA ($0,6 \times 10^{-3} \text{M}$) [7]. Дослідження інтенсивності дихання сперми проводили у фосфатно – сольовому буфері (ФСБ; NaCl –0,8 г, KCl –0,02 г, Na_2HPO_4 –0,11 г, KH_2PO_4 –0,02 г, MgCl_2 –0,01 г, H_2O до 100 мл). Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за Н. А. Плохинським [8].

Результати досліджень. Свіжоотримана сперма кнурів характеризується активністю КАТ – $0,22 \pm 0,05$ мкмоль/хв×мг протеїну та інтенсивністю споживання кисню – $4,7 \pm 0,2$ нг-атом О/хв×0,1 мл сперми і виживанням спермій при 2 – 4° С — 116 ± 22 год.

Аналізом кореляцій між активністю КАТ та інтенсивністю дихання сперми встановлено, що за менше 0,20 мкмоль/хв×мг протеїну в еякулятах споживання кисню $6,2 \pm 0,91$ нг-атом О/(хв×0,1 мл сперми), а за більше 0,20 мкмоль/хв×мг протеїну зменшується на 40 – 44 % ($P < 0,05$; табл.). Кореляція між активністю ензиму та

Зв'язок активності каталази з дихальною активністю сперми та виживанням спермій

Показник	Активність каталази, мкмоль/хв×мг білка						η
	0,20 <		0,20 – 0,30		> 0,30		
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	
Дихальна активність, нг-атом О/(хв × 0,1мл сперми): сперми	5	6,2±0,91	4	3,5±0,25*	3	3,7±0,27*	0,688
з інгібіторами: NaF	5	3,8±0,18	4	2,8±0,54	3	3,3±0,27	0,240
амітал	5	2,8±0,07	4	1,3±0,22**	3	2,3±0,27	0,391
натрій азид	5	3,3±0,11*	4	3,8±0,14	3	0,5±0,04***	0,653
Na_2EDTA	5	2,5±0,08	4	0,3±0,10***	3	0,7±0,09***	0,661
Вживання, год	6	85 ± 7***	5	153 ± 12	5	128 ± 6	0,711

*Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до максимальної величини значення показника: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001*

споживанням кисню спермою кнурів середньої сили ($\eta = 0,688$).

За підвищення в еякулятах активності КАТ з мінімальної (менше 0,20 мкмоль/хв×мг протеїну) до максимальної (більше 0,30 мкмоль/хв×мг протеїну) величин на фоні дії інгібітора гліколізу (NaF) інтенсивність дихання майже не змінюється (різниця становить 13 – 26 % і статистично не вірогідна; $P > 0,05$). Зв'язок між активністю ензиму та дихальною активністю за дії інгібітора гліколізу слабкий ($\eta = 0,240$). Тобто, підвищення активності КАТ, зумовлене зростанням утворення H_2O_2 , зі слабкою силою гальмує перебіг аеробного гліколізу і використання Оксигену за рахунок вказаного процесу для ресинтезу АТФ.

Інтенсивність дихання сперми в присутності інгібітора НАД-залежної ланки ланцюга дихання мітохондрій (аміталу) найнижча ($1,3 \pm 0,22$ нг-атом О/(хв×0,1 мл сперми) за активності ензиму 0,20 – 0,30 мкмоль/хв×мг протеїну і вища на 53 % ($P < 0,01$) та 44 % ($P < 0,05$), відповідно, за низької (менше 0,20 мкмоль/хв×мг протеїну) та високої (більше 0,30 мкмоль/хв×мг протеїну) активності КАТ. Кореляційне відношення за активністю КАТ для інтенсивності споживання кисню спермою кнурів в присутності аміталу середньої сили криволінійне ($\eta = 0,391$). Отже, за середньої активності КАТ (0,20 – 0,30 мкмоль/хв×мг протеїну) виникає диспропорція між здатністю знищувати і нагромадженням H_2O_2 в процесі транспорту електронів через НАД-залежну ланку дихального ланцюга мітохондрій.

При аналізі залежності дихальної активності сперми від активності КАТ за дії інгібітора цитохромоксидази виявлено, що за менше 0,30 мкмоль/хв×мг протеїну інтенсивність дихання сперми висока ($3,3 – 3,8$ нг-атом О/(хв×0,1 мл сперми), а за більше 0,30 мкмоль/хв×мг протеїну в $6,6 – 7,6$ ($P < 0,05 – 0,001$) разів нижча. Кореляційне

відношення за активністю КАТ для інтенсивності споживання кисню спермою кнурів в присутності натрію азиду негативне середньої сили ($\eta = 0,653$). Тобто, існує межа активності ензиму за якої підтримується оптимальне функціонування термінальної ланки дихального ланцюга мітохондрій спермійв кнурів. Ймовірно, підвищена активність КАТ і відповідне утворення надлишку H_2O_2 , гальмує здатність цитохромоксидази транспортувати електрони на акцептор – Оксиген.

При інгібуванні вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот сперми висока інтенсивність дихання ($2,5 \pm 0,08$ нг-атом $O/(xv \times 0,1$ мл сперми) виявлена за активності КАТ менше $0,20$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну і нижча в $3,6 - 8,3$ ($P < 0,001$) разів за більше $0,30$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну. Зв'язок між дослідженими показниками в спермі кнурів негативний середньої сили ($\eta = 0,661$). Отже, активування КАТ, на фоні блокування дихального ланцюга мітохондрій і ймовірного зростання вільнорадикального окиснення ненасичених жирних, характеризує, з одного боку, утворення нефізіологічних концентрацій H_2O_2 , а з другого – ефективне гальмування процесів пероксидного окиснення, які супроводжуються інтенсивним споживанням кисню.

При аналізі зв'язку КАТ з виживанням спермійв встановлено, що активність ензиму позитивно корелює з фізіологічним показником статевих клітин кнурів. Так, за активності до $0,20$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну КАТ виживання спермійв – 85 ± 7 год. Зростання активності до $0,30$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну характеризує підвищення величини фізіологічного показника на 68 год ($P < 0,001$), а при більше $0,30$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну виживання спермійв – 128 ± 6 год, що нижче максимуму на 25 год (16,4 %), але вище вихідного значення на 43 год (33,6 %; $P < 0,001$). Кореляційне відношення за активністю КАТ для виживання спермійв кнурів позитивне сильне ($\eta = 0,711$).

Таким чином, активність КАТ характеризує виживання спермійв кнурів, а сила впливу залежить від інтенсивності окисного метаболізму в еякулятах і статевих клітинах. Встановлені кореляції між дослідженими показниками в спермі вказують на безпосередню участь ензиму в захисті статевих клітин від руйнівної дії АФО, а активність КАТ свіжоотриманої сперми є маркером фізіологічної якості спермійв кнурів.

Висновки: 1. Активність каталази в еякулятах кнурів $0,22 \pm 0,05$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну, дихальна активність $4,7 \pm 0,2$ нг-атом $O/(xv \times 0,1$ мл сперми) та виживанням спермійв – 116 ± 22 год.

2. Від активності ензиму залежить інтенсивність споживання кисню спермою. Найвища інтенсивність дихання сперми встановлена за менше $0,20$ мкмоль/ $xv \times$ мг протеїну КАТ. Кореляція між активністю ензиму та споживанням кисню негативна середньої сили ($\eta = 0,688$).

3. В еякулятах кнурів зв'язок між активністю КАТ та інтенсивністю споживання кисню спермою за дії натрію фториду слабкий ($\eta = 0,240$), в присутності аміталу і натрію азиду середньої сили, відповідно, криволінійний ($\eta = 0,391$) і негативний ($\eta = 0,653$). За дії Na_2EDTA зв'язок між дослідженими показниками негативний середньої сили ($\eta = 0,661$).

4. Встановлений сильний позитивний зв'язок між активністю КАТ та виживанням спермійв кнурів ($\eta = 0,711$).

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Baumber J. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa / Baumber J., Ball B., Meyer J., Meyers S. // *Journal of Andrology* – 2003 – V. 24, No. 4. – P. 621–628.
2. Ford W.C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species // *Human reproduction*. – 2004. – V. 10, No. 5. – P. 387–399.
3. Rivlin J. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. / Mendel J., Rubinstein S., Ektovitz N., Breitbart H. // *Biol. Reprod.* – 2004. – V. 70. – P. 518–522.
4. Scibior D. Catalase: structure, properties, functions. / Scibior D., Czczot H. // *Postepy. Hig. Med. Dosw.* – 2006. – V. 60. – P. 170–180.

5. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. // Лаб. дело. – 1991. – №12. – С. 16–19.

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

7. Методы измерения дыхательной активности микросом / Современные методы в биохимии // В. Н. Орехович– М.: Медицина, 1977. — С. 59–60.

8. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: МГУ. – 1970. – С. 53–60.

Кузьмина Н. В., Остапив Д. Д., Яремчук И. М., Корнят С. Б., Горчин С. В.

Активность каталазы, интенсивность дыхания и выживание спермиев в эякулятах хряков

Установлено, что эякуляты хряков характеризуются активностью каталазы (КАТ) – $0,22 \pm 0,05$ мкмоль/мин × мг протеина, дыхательной активностью – $4,7 \pm 0,2$ нг-атом O/(мин × 0,1 мл спермы), выживанием спермиев – 116 ± 22 год. Активность энзима влияет на интенсивность потребления кислорода спермой и выживание спермиев. При активности КАТ меньше $0,20$ мкмоль/мин × мг протеина интенсивность дыхания спермы хряков наивысшая – $6,2 \pm 0,91$ нг-атом O/(мин × 0,1 мл спермы) и уменьшается на 40 – 44 % ($P < 0,05$) при больше $0,20$ мкмоль/мин × мг протеина. Корреляция между активностью энзима и потреблением кислорода отрицательная средней силы ($\eta = 0,688$). В эякулятах хряков связь между активностью КАТ и интенсивностью потребления кислорода спермой при влиянии натрия фторида слабая ($\eta = 0,240$), в присутствии амита и натрия азиды средней силы, соответственно, криволинейная ($\eta = 0,391$) и негативная ($\eta = 0,653$). При влиянии Na_2EDTA связь между исследованными показателями негативная средней силы ($\eta = 0,661$). Установленная сильная положительная связь между активностью КАТ и выживанием спермиев хряков ($\eta = 0,711$) может быть использована для оценки физиологических характеристик половых клеток.

Ключевые слова: активность каталазы, интенсивность дыхания, ингибиторы, выживание спермиев, сперма, хряки.

N. V. Kuzmina, D. D. Ostapiv, I. M. Yaremchuk, S. B. Kornjat, S. V. Horchin.

Catalase activity, respiration intensity and spermatozoa survival in the semen of boar ejaculate

It was determined, that boar ejaculates characterize by catalase activity (CAT) $0,22 \pm 0,05$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/(\text{min} \times \text{mg of protein})$, respiration activity – $4,7 \pm 0,2$ ng atom. O/(min × 0,1ml of semen) and spermatozoa survival – 116 ± 22 h. Enzymatic activity affects the intensity of oxygen consumption by sperm and spermatozoa survival. At CAT activity less than $0,20$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/(\text{min} \times \text{mg of protein})$ semen respiration of boar ejaculates is the highest – $6,2 \pm 0,91$ ng atom. O/(min × 0,1ml of semen), and oxygen consumption is lower on 40–44% ($P < 0,05$) at bigger enzymatic activity (0.20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/(\text{min} \times \text{mg of protein})$). The correlation between CAT activity and oxygen consumption rate has negative medium strength ($\eta = 0,688$). In boar ejaculates the relationship between CAT activity and oxygen consumption intensity by sperm is weak at sodium fluoride effect ($\eta = 0,240$). In the presence of sodium azide and amital correlation has medium strength, respectively, curvilinear ($\eta = 0,391$) and negative ($\eta = 0,653$). At action of Na_2EDTA relationship between studied indexes has medium negative strength ($\eta = 0,661$). A strong positive relationship between CAT activity and survival of spermatozoa ($\eta = 0,711$) can be used to evaluate the physiological characteristics of germ cells.

Key words: catalase activity, respiration intensity, inhibitors, spermatozoa survival, sperm, boars.