

АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ІЗОФОРМ МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗИ І ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ У ЕЯКУЛЯТАХ САМЦІВ

Кузьміна Н.В.

Інститут біології тварин НААН

Вивчали активність і вміст ізоформ малатдегідрогенази у спермі самців та виживання спермій. Встановлено, що еякуляти характеризуються активністю малатдегідрогенази: кнур - $0,27 \pm 0,09$ нмоль/хв*мг білка, бугая - $0,31 \pm 0,07$ нмоль/хв*мг білка і чоловіка - $0,35 \pm 0,09$ нмоль/хв*мг білка та виживанням спермій при 2 - 4°C, відповідно, $116,0 \pm 21,5$, $114,2 \pm 31,78$ і $101,4 \pm 29,50$ год. Активність МДГ проявляє пряму кореляцію з виживанням спермій: у спермі кнура та бугая - сильну ($\eta = 0,807$, $\eta = 0,745$), у чоловіка – середньої сили ($\eta = 0,559$). Вміст ізоформ МДГ у спермі залежить від виду самців і характеризується неоднозначним впливом на виживання спермій. За високого вмісту МДГ1-ізоформи проявляється найвище виживання спермій у еякулятах чоловіка і кнура, а МДГ3-ізоформи – у кнура і бугая. Для спермій ссавців з низьким виживанням характерний високий вміст МДГ2-ізоформи.

Ключові слова: малатдегідрогеназа, активність, ізоформи, виживання спермій, сперма, електрофорез.

Activity and content of isoforms of malatedehydrogenase and survival of spermatozoa in male ejaculates. Kuzmina N.V. – Activity and isoform content of malatedehydrogenase (MDG) in male semen and survival of spermatozoa was studied. It was found that ejaculates are characterized by activity of malatedehydrogenase: in boar $0,27 \pm 0,09$ nmol/min*mg of protein, in bull $0,31 \pm 0,07$ nmol/min*mg of protein, man – $0,35 \pm 0,09$ nmol/min*mg of protein and by spermatozoa survival at 2 – 4°C: $116,0 \pm 21,5$, $114,2 \pm 31,78$ і $101,4 \pm 29,50$ h. Activity of malatedehydrogenase shows direct correlation with survival of spermatozoa: in bull and boar semen – strong ($\eta = 0,807$, $\eta = 0,745$), in man sperm average ($\eta = 0,559$). Content of malatedehydrogenase isoforms depends on species and characterizes by controversial impact on spermatozoa survival. With high content of MDG-1 survival of man and boar spermatozoa, and MDG-3 in boar and bull semen is higher. Male sperm with low survival is characterized by high content of MDG-2.

Key words: malatedehydrogenase, activity, isoforms, spermatozoa survival, semen, electrophoresis.

ВСТУП

Для оцінювання еякулятів самців важливим є виявлення маркерів фізіологічних якостей і запліднювальної здатності статевих клітин. Так, увагу привертають дослідження процесів, які забезпечують і регулюють ресинтез АТФ і, відповідно, здатність до пряmlinійного поступального руху спермій. Це зумовлено тим, що незалежно

від метаболічного шляху забезпечення енергією (гліколізом чи диханням), спільним для статевих клітин різних видів самців є присутність мітохондрій і ферментів, які постачають субстрати в цикл трикарбонових кислот та транспортують електрони у ланцюзі дихання [3, 4]. До складу таких ензимів належить малатдегідрогеназа (МДГ) - компонент малат-аспартатного шунта. Встановлено, що активність ферменту проявляє кореляцію з якістю і запліднювальною здатністю статевих клітин [5, 9]. Проте, ензим локалізуються як в матриксі мітохондрій, так і в цитозолі клітин, що визначає неоднаковий вклад його ізоформ у генерування енергії сперміями [7, 8]. Тобто, сумарна активність МДГ не завжди свідчить про інтенсивність ресинтезу АТФ і, відповідно, про фізіологічний стан статевих клітин.

Мета досліджень – вивчити активність та вміст ізоформ малатдегідрогенази у еякулятах різних видів самців та встановити зв'язки біохімічних показників з виживанням статевих клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти чоловіка, (n=40), бугая (n=55) і кнура (n=18). У спермі вивчали активність (нмоль/хв*мг білка) [2] та ізоформи (%) МДГ і виживання сперміїв (год.) до припинення прямолінійного поступального руху. Ізоформи МДГ виявляли електрофорезом у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ) для чого цільну сперму розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5) і додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (концентрація білка 100-200 мкг). Для виявлення ізоформ МДГ після електрофорезу гель фарбували методом J. Garbusa [5] у нашій модифікації: ПААГ інкубували 60 хв. у темноті при температурі 37°C в 0,1 М Трис/НСІ буфері (рН 8,5) з 0,1 мг/мл феназинметасульфату (ФМС), 0,2 М малату, 0,5 мг/мл НАД та 0,5 мг/мл нітросинього тетразолію (НСТ). У процесі ферментативної реакції, що каталізує МДГ НАД⁺ відновлюється до НАДН, який при взаємодії з ФМС генерує супероксиданіон радикали, останні відновлюють НСТ до нерозчинного нітроформазану. У місцях локалізації ізоформ ензиму гель набуває фіолетового кольору. Статистичний аналіз отриманого матеріалу проведено за М. О. Плохінським [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Активність МДГ низька у спермі кнура ($0,27 \pm 0,09$ нмоль/хв*мг білка), вища на 11,5 % у бугая ($0,31 \pm 0,07$ нмоль/хв*мг білка) і найви-

ща у еякулятах чоловіка ($0,35 \pm 0,09$ нмоль/хв*мг білка). При цьому, виживання статевих клітин при $2-4^\circ\text{C}$ у спермі чоловіка становить $101,4 \pm 29,50$ год., кнур – $116,0 \pm 21,5$ год. і бугая – $114,2 \pm 31,78$ год. Таким чином, у еякулятах самців існують слабкі видові відмінності як активності МДГ, так і виживання статевих клітин, що зумовлено локалізацією ферменту і фізіологічно визначеними особливостями спермій ссавців.

Однак, від виду самців залежать спектр і вміст ізоформ МДГ (рис. 1).

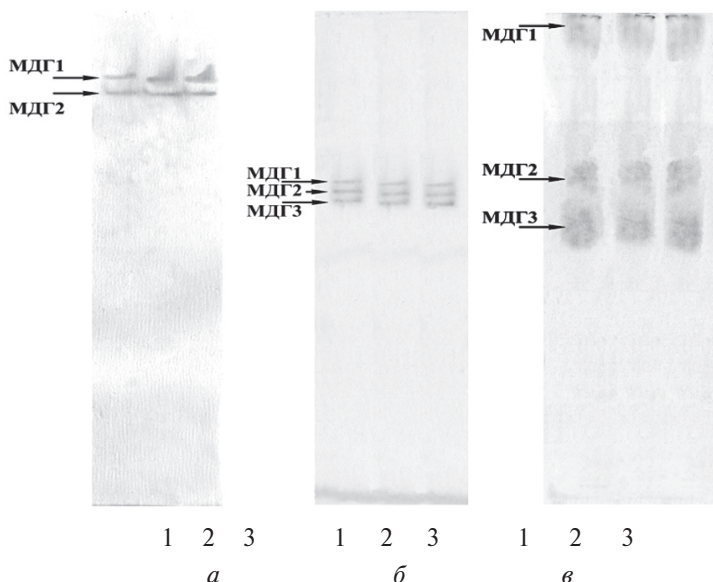


Рис. 1. Білки МДГ сперми: *а* – чоловіка; *б* – кнур; *в* – бугая; 1 – 3 зразки сперми; МДГ1 – МДГ3 – ізоформи ферменту

Видові особливості спектру ізоферментів проявляються різною швидкістю міграції у ПААГ, кількістю смуг білків та інтенсивністю і площею їх зафарбування. Так, у спермі чоловіка проявляються дві ізоформи МДГ, а у кнур і бугая – три. При цьому, ізоформи МДГ1 та МДГ2 у еякулятах чоловіка мають низьку електрофоретичну рухливість і вищу – у кнур. Для сперми бугая характерна найнижча рухливість МДГ1 і найвища – для МДГ2 та МДГ3 порівняно з іншими видами самців. Виявлені відмінності ізоферментного складу при візуальному оцінюванні електрофореграм підтверджуються різним вмістом окремих ізоформ у загальному спектрі білків фер-

менту. Так, вміст ізоформи МДГ1 не залежить від виду самця, величина значення знаходиться в межах $21,5 \pm 3,90$ – $28,0 \pm 5,03$ %. Вищу видову залежність проявляють МДГ2- і МДГ3-ізоформи. Зокрема, у спермі чоловіка вміст МДГ2 максимальний ($77,2 \pm 5,77$ %), а МДГ3 – відсутня, у кнурі і бугая – МДГ2 становить відповідно $28,2 \pm 9,04$ і $22,2 \pm 6,23$ %, що нижче, ніж у чоловіка на $49,0$ – $55,0$ % ($p < 0,001$), а МДГ3 – майже однаковий ($42,7 \pm 4,80$ і $49,8 \pm 6,77$ %).

Вживання сперміїв залежить від активності МДГ. Так, при низькій активності ферменту (менше $0,20$ нмоль/хв*мг білка) величина фізіологічного показника у еякулятах самців майже однакова: у чоловіка – $70,0 \pm 7,1$ год., кнурі – $85 \pm 6,6$ год. і бугая – $82 \pm 7,7$ год. (табл. 1). Підвищення активності МДГ до $0,30$ нмоль/хв*мг білка супроводжується зростанням величини фізіологічного показника на $30,8$ год. ($35,2$ %; $p < 0,01$) у чоловіка, на 43 год. ($33,6$ %; $p < 0,001$) у кнурі і на 20 год. ($26,8$ %; $p < 0,05$) у бугая. За максимальної активності ферменту (більше $0,30$ нмоль/хв*мг білка) вживання сперміїв найвище: $120 \pm 10,8$ год. – у чоловіка, $168 \pm 2,0$ год – у кнурі і $140 \pm 4,7$ год – у бугая. Кореляційне відношення за активністю МДГ для вживання сперміїв у свіжотриманій спермі чоловіка середньої сили ($\eta = 0,559$), кнурі і бугая сильне (відповідно, $\eta = 0,807$ і $0,745$).

Таблиця 1

Зв'язок активності МДГ у еякулятах самців з вживання сперміїв

Еякуляти	Вживання сперміїв (год.) за активності:						η
	МДГ, нмоль/хв*мг білка						
	0,20 <		0,20–0,30		> 0,30		
	n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m	
чоловіка	15	$70,0 \pm 7,1$	10	$108 \pm 8,3^{**}$	7	$120 \pm 10,8^{***}$	0,559
кнурі	4	$85 \pm 6,6$	7	$128 \pm 6,5^{***}$	3	$168 \pm 2,0^{***}$	0,807
бугая	14	$82 \pm 7,7$	17	$112 \pm 4,2^*$	13	$140 \pm 4,7^{***}$	0,745

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до мінімальної величини значення – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Встановлена неоднозначна сила кореляції зумовлена, на нашу думку, особливостями енергетичного забезпечення сперміїв, перевагою гліколітичного чи аеробного шляхів ресинтезу АТФ і часткою, яка реалізується у вказаному процесі за участі малатдегідрогенази.

Вживанням спермійв залежить не тільки від активності ферменту у спермі, а й від вмісту його ізоформ. Так, за низького вмісту МДГ1-ізоформи (менше 20,0 %) у спермі чоловіка величина фізіологічного показника становить $74 \pm 5,5$ год., при підвищенні до 30,0 % зростає на 70 год. (48,7 %; $p < 0,001$) і при максимальному вмісті (більше 30,0 %) залишається на тому ж рівні ($144 \pm 7,4$ год.; табл. 2).

Таблиця 2

Зв'язок вмісту МДГ-ізоформ з вживанням спермійв

Еякуляти	Вживання спермійв (год.) за вмісту:						η
	МДГ1-ізоформи, %						
	20,0 <		20,0 – 30,0		> 30,0		
	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n	$M \pm m$	
чоловіка	19	$74 \pm 5,5$	4	$144 \pm 12,0^{***}$	8	$144 \pm 7,4^{***}$	0,814
кнур	4	$84 \pm 6,0$	6	$100 \pm 11,5^{**}$	5	$152 \pm 6,6^{***}$	0,688
бугая	4	$106 \pm 18,2$	12	$118 \pm 11,7$	15	$107 \pm 5,7$	0,159
МДГ2-ізоформи, %							
кнур	3	$176 \pm 26,1$	5	$129 \pm 5,2^*$	7	$82 \pm 4,5^{**}$	0,846
бугая	14	$126 \pm 5,6$	13	$101 \pm 7,5^*$	4	$71 \pm 14,3^{**}$	0,555
-	75,0 <		75,0 – 85,0		> 85,0		-
чоловіка	14	$128 \pm 8,4$	10	$108 \pm 10,0^*$	7	$63 \pm 5,5^{***}$	0,559
МДГ3-ізоформи, %							
-	40,0 <		40,0 – 50,0		> 50,0		-
кнур	6	$84 \pm 4,9$	5	$115 \pm 10,2^*$	4	$168 \pm 10,8^{**}$	0,785
бугая	4	$89 \pm 7,0$	18	$105 \pm 8,4$	9	$135 \pm 5,5^{**}$	0,639
чоловіка	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до мінімального значення – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

У еякулятах кнурів зі збільшенням МДГ1-ізоформи вживання спермійв пропорційно зростає. Так, за низького вмісту ізоформи (менше 20,0 %) вживання низьке ($84 \pm 6,0$ год.), при збільшенні до 30,0 % зростає на 16 год. (16,0 %) і за максимального значення (більше 30,0 %) становить $152 \pm 6,6$ год., що вище попередньої величини на 52 год. (34,3 %; $p < 0,01$) та вихідної на 68 год. (44,8 %; $p < 0,001$). У еякулятах бугаїв від вмісту МДГ1-ізоформи вживання спермійв залежить слабо, величина середнього значення у класах

варіаційного ряду знаходиться в межах 106 – 118 год., різниця становить 12 год. (10,2 %) і знаходиться в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом МДГ1-ізоформи для виживання сперміїв у свіжотриманій спермі чоловіка сильне ($\eta = 0,814$), кнур - середньої сили ($\eta = 0,688$), а бугая – слабке ($\eta = 0,159$). Вміст МДГ2-ізоформи проявляє обернену залежність з виживанням сперміїв самців. Так, за низького вмісту вказаної ізоформи (у еякулятах кнурів та бугаїв - менше 20,0 % і чоловіка - менше 75,0 %) виживання статевих клітин високе: у кнур - $176 \pm 26,1$ год, бугая - $126 \pm 5,6$ год та чоловіка - $128 \pm 8,4$ год. У спермі за вишого вмісту МДГ2-ізоформи (у кнурів та бугаїв – до 30,0 % і чоловіка – до 85,0 %) величина фізіологічного показника знижується відповідно на 47 год. (26,8 %), 25 год. (19,9 %; $p < 0,05$) і 20 год. (15,7 %; $p < 0,05$). Наступне підвищення в еякулятах вмісту МДГ2-ізоформи: у кнурів та бугаїв – більше 30,0 % і чоловіка - більше 85,0 %, ще знижує виживання сперміїв, відповідно, на 47 год. (36,5 %; $p < 0,001$), 30 год. (29,8 %) і 45 год. (41,7 %; $p < 0,01$), що нижче вихідного значення на 94 год. (53,5 %; $p < 0,01$), 55 год. (43,7 %; $p < 0,01$) і 65 год. (50,8 %; $p < 0,001$). Кореляційне відношення за вмістом МДГ2-ізоформи для виживання сперміїв у свіжотриманій спермі кнур сильне ($\eta = 0,846$), чоловіка і бугая середньої сили (відповідно, $\eta = 0,555$ і $0,559$).

Вміст МДГ3-ізоформи проявляє пряму залежність з виживанням сперміїв у еякулятах самців. Зокрема, у спермі кнур і бугая за низького вмісту ізоформи (менше 40,0 %) виживання сперміїв майже однакове і становить відповідно $84 \pm 4,9$ і $89 \pm 7,0$ год. Підвищення вмісту МДГ3-ізоформи до 50,0 % характеризує збільшення тривалості виживання статевих клітин на 31 год. (27,0 %; $p < 0,05$) у еякулятах кнур і на 16 год. (15,3 %) - у бугая і при максимальному вмісті (більше 50,0 %) величина фізіологічного показника ще зростає відповідно на 53 год. (31,6 %; $p < 0,01$) і 30 год. (22,3 %; $p < 0,01$). Кореляційне відношення за вмістом МДГ3-ізоформи для виживання сперміїв у свіжотриманій спермі кнур сильне ($\eta = 0,785$), а у бугая – середньої сили ($\eta = 0,639$).

Отже, для характеристики виживання сперміїв у спермі чоловіка має значення вміст МДГ1-ізоформи, а еякулятів кнур – МДГ2- і МДГ3- ізоформ. Для виживання сперміїв бугая, очевидно, вміст ізоформ МДГ може мати суттєве значення за умов активування процесів ресинтезу АТФ аеробним шляхом (розрідження еякулятів сердовищами для зберігання сперми поза організмом самця).

ВИСНОВКИ

Сперма самців характеризується активністю малатдегідрогенази: $0,27 \pm 0,09$ нмоль/хв*мг білка - у кнура, $0,31 \pm 0,07$ нмоль/хв*мг білка - у бугая $0,35 \pm 0,09$ нмоль/хв*мг білка - у чоловіка і виживанням сперміїв при 2 - 4°C, відповідно, $116,0 \pm 21,5$, $114,2 \pm 31,78$ і $101,4 \pm 29,50$ год.

Активність МДГ проявляє пряму кореляцію з виживанням сперміїв, сила якої визначається присутністю субстратів і особливостями їх використання статевими клітинами для ресинтезу АТФ.

Вміст ізоформ МДГ у спермі залежить від виду самців і характеризується неоднозначним впливом на виживання сперміїв. За високого вмісту МДГ1-ізоформи проявляється найвище виживання сперміїв у еякулятах чоловіка і кнура, а МДГ3-ізоформи – у кнура і бугая. Для сперміїв ссавців з низьким виживанням характерний високий вміст МДГ2-ізоформи.

Отримані результати можуть бути використані для розробки тест-систем оцінювання фізіологічної якості сперміїв.

Література

1. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский // М.: Колос, 1969. — 255 с.
2. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. / Кочетов Г.А. // М.: Высшая школа, 1980. — 380 с.
3. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных. /Шергин Н.П.// – М.: Колос, 1967. — 239с.
4. Яблонский В.А. Видовые особенности обмена веществ в сперме быка, барана и хряка: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Львов, 1970. — 34 с.
5. Cordoba M. Differential activities of malate and isocitrate NAD(P) -dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. / Cordoba M., Pintos L., Beconi M.T. // Andrologia. — 2005. — Vol.37, No. 1. — P.40–46.
6. Garbus J. Serum malate dehydrogenase isoenzymes as indicators of severe cellular injury. /Garbus J. // Clin. Chim. Acta. — 1971. — Vol. 35. — P. 502-504.
7. Malate dehydrogenases--structure and function. / [Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, Antalík M.] // Gen Physiol Biophys. — 2002. — Vol. 3 — P. 257–265.
8. Disruption of mitochondrial malate-aspartate shuttle activity in mouse blastocysts impairs viability and fetal growth. / [Mitchell M., Cashman K.S., Gardner D., et all. // Biology of Reproduction. — 2009. — Vol. 80, No. 2. — P. 295-301.
9. Tzvetkov D. Electron microscopic and enzyme investigations of the testicular tissue in infertile males. /Tzvetkov D., Martinova J., Usunova J., Dimitrov S. // Int. Urol. Nephrol. — 1986. — Vol. 18, No. 3. — P. 315–320.

Активность, содержание изоформ малатдегидрогеназы и выживание спермиев в эякулятах самцов. Кузьмина Н.В. — Изучали активность и содержание изоформ малатдегидрогеназы в сперме самцов и выживание спермиев. Установлено, что эякуляты характеризуются активностью малатдегидрогеназы: борова - $0,27 \pm 0,09$ нмоль/мин.*мг белка, быка - $0,31 \pm 0,07$ нмоль/мин.*мг белка и мужчины - $0,35 \pm 0,09$ нмоль/мин.*мг белка и выживанием спермиев при $2-4^{\circ}\text{C}$, соответственно, $116,0 \pm 21,5$, $114,2 \pm 31,78$ и $101,4 \pm 29,50$ час. Активность МДГ проявляет прямую корреляцию с выживанием спермиев: в сперме борова и быка - сильную ($\eta = 0,807$, $\eta = 0,745$), у мужчины - средней силы ($\eta = 0,559$). Содержание изоформ МДГ в сперме зависит от вида самцов и характеризуется неоднозначным влиянием на выживание спермиев. При высоком содержании МДГ1-изоформы проявляется наивысшее выживание спермиев в эякулятах мужчины и борова, а МДГ3-изоформы — у борова и быка. Для спермиев самцов с низким выживанием характерно высокое содержание МДГ2-изоформы.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, активность, изоформы, выживание спермиев, сперма, электрофорез.