

ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ І ТВАРИН

УДК 636.2:577.15:612.616.

**ОСОБЛИВОСТІ СПОЖИВАННЯ КИСНЮ Й АКТИВНІСТЬ
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ СПЕРМИ ССАВЦІВ**

Н. Кузьміна, Д. Остапів

*Інститут біології тварин НААН України
вул. Стуса, 38, Львів 79034, Україна
e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua*

Проведено дослідження окисних процесів у еякулятах чоловіків, кнурів і бугаїв. Встановлено, що вищою інтенсивністю споживання кисню й активністю супероксиддисмутази (СОД) характеризується сперма бугаїв ($8,1 \pm 0,6$ нг-атом $O/xv \times 0,1$ мл сперми і $4,2 \pm 0,3$ МО/мг протеїну) і нижчими – чоловіків і кнурів (відповідно, $4,9 \pm 0,7$ і $4,7 \pm 0,2$ нг-атом $O/xv \times 0,1$ мл сперми та $4,1 \pm 0,6$ і $3,9 \pm 0,2$ МО/мг протеїну). Дихальна активність сперми чоловіків характеризується високою інтенсивністю аеробного гліколізу та вільнорадикального окиснення жирних кислот, активністю цитохромоксидази і низькою активністю NADH-дегідрогенази. Для еякулятів бугаїв властиві низька інтенсивність аеробного гліколізу та вільнорадикального окиснення жирних кислот і низька активність NADH-дегідрогенази й цитохромоксидази. Сперма кнурів за інтенсивністю окисних процесів займає проміжне місце між еякулятами чоловіків і бугаїв. Зв'язок між активністю СОД та інтенсивністю дихання сперми бугаїв прямий середньої сили ($\eta=0,501-0,568$). Для сперми чоловіків і кнурів характерне зниження інтенсивності дихання за підвищення активності ензиму ($\eta=0,320-0,477$).

Ключові слова: інтенсивність дихання, активність супероксиддисмутази, інгібітори дихання, сперма.

Для сперміїв, як і для інших клітин організму ссавців, характерні всі ланки окисного метаболізму [5]. При цьому інтенсивність окисно-відновних процесів у статевих клітинах залежить від технологічних процесів підготовки еякулятів для зберігання поза організмом, видових та індивідуальних особливостей самців, маніпуляцій при заплідненні *in vivo* та *in vitro* [1, 6]. Водночас зміни інтенсивності перебігу процесів окиснення супроводжуються утворенням активних форм Оксигену (АФО). З одного боку, генерація АФО ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot-}$, H_2O_2) є необхідною умовою для дозрівання, функціонування та здатності сперміїв запліднювати ооцит [8, 9]. Доведено, що супероксид-аніон радикали ($O_2^{\cdot-}$) разом з іншими чинниками беруть участь у збільшенні концентрації внутрішньоклітинного цАМФ, необхідного для запуску каскаду реакцій фосфорилування тирозину і капацитації сперміїв [10]. При цьому встановлено, що у статевих клітинах основними ділянками генерації $O_2^{\cdot-}$ є NADH-оксидоредуктазний комплекс електрон-транспортного ланцюга мітохондрій і NADPH-оксидаза, що розташована в цитоплазматичній мембрані [7]. З іншого боку, надмірно висока інтенсивність утворення АФО, в тому числі й $O_2^{\cdot-}$, призводить до ушкодження мембран, втрати рухливості й загибелі статевих клітин. Основним ферментом, що регулює і підтримує на оптимальному рівні вміст $O_2^{\cdot-}$, є СОД [12].

Мета роботи – вивчити інтенсивність процесів споживання кисню і активність СОД та виявити особливості кореляційних зв'язків між досліджуваними показниками сперми чоловіків, кнурів і бугаїв.

Матеріали та методи

Досліджували свіжоотримані еякуляти чоловіків (n=45), кнурів (n=18) і бугаїв (n=60). Сперму бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень, кнурів – мануальним методом, сперма чоловіків отримана від донорів-добровольців. Для досліджень відібрані еякуляти чоловіків об'ємом $2,7 \pm 0,7$ мл, концентрацією сперміїв $58,8 \pm 2,8 \times 10^6$ клітин/мл, кнурів та бугаїв, відповідно, $105,1 \pm 30,2$ і $4,2 \pm 1,8$ мл та $370,5 \pm 43,5 \times 10^6$ і $1,1 \pm 0,5 \times 10^9$ клітин/мл. У спермі визначали активність СОД [4], концентрацію протеїну [11], споживання кисню – полярографічно (нг-атом О/хв \times 0,1 мл сперми) за температури $38,5^\circ\text{C}$. Оскільки ресинтез АТФ сперміями свавців здійснюється у ході гліколізу і дихання, то 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 кисню у процесі вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот застосовували Na_2EDTA ($0,6 \times 10^{-3}\text{M}$) [2]. 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 [3].

Результати і їхнє обговорення

Вищою інтенсивністю споживання кисню характеризується сперма бугаїв ($8,1 \pm 0,6$ нг-атом О/хв \times 0,1 мл сперми) і нижчою та майже однаковою, чоловіків і кнурів ($4,9 \pm 0,7$ та $4,7 \pm 0,2$ нг-атом О/хв \times 0,1 мл сперми (табл. 1). Враховуючи той факт, що поряд з окисненням компонентів плазми сперми (ліпідів і протеїнів), основна частина кисню споживається сперміями у ланцюгу дихання мітохондрій, відповідно, в перерахунку на однакову концентрацію сперміїв у еякуляті (10^6 клітин) максимальна дихальна активність характерна для сперміїв чоловіка – $0,83 \pm 0,25$ нг-атом О/хв $\times 10^6$ клітин, на 84,3% нижча для кнурів і найнижча для бугая ($0,07 \pm 0,01$ нг-атом О/хв $\times 10^6$ клітин).

Таблиця 1

Дихальна активність сперми

Дихальна активність, нг-атом О/хв \times 0,1 мл сперми	Еякуляти					
	чоловіків		кнурів		бугаїв	
	n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m
сперми	33	4,9 \pm 0,7	12	4,7 \pm 0,2	40	8,1 \pm 0,6***
в т.ч. за дії інгібіторів: NaF	32	2,9 \pm 0,1	12	3,3 \pm 0,9	32	6,1 \pm 0,6***
амітал	32	2,6 \pm 0,2	12	2,2 \pm 0,7	32	4,5 \pm 0,5**
NaN_3	32	2,0 \pm 0,5	12	1,7 \pm 0,8	32	3,6 \pm 0,3**
Na_2EDTA	32	1,5 \pm 0,6	12	1,3 \pm 0,6	32	3,1 \pm 0,5**

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальною величиною значення показника: **P<0,01; ***P<0,001

За використання інгібітора енолази (NaF) виявлено вміст кисню, що використаний аеробним гліколізом: для сперміїв чоловіків частка становить 40,9%, кнурів – 29,8% і бугаїв – 24,7%. Отже, сперма чоловіків характеризується високою активністю аеробного окиснення глюкози, нижчою – сперма кнурів і найнижчою – бугаїв.

За дії інгібітора NAD-залежної ланки ланцюга дихання мітохондрій аміталу споживання кисню спермою, порівняно з попереднім значенням, ще знижується: у спермі чоловіків на 10,4%, кнурів – на 33,4% і бугаїв – на 26,3%, і нижче вихідного, відповідно,

на 47,0, 53,2 і 44,5%. Отже, у спермі кнурів, за обмеженого надходження пірувату в цикл Кребса, NAD-залежна ланка ланцюга дихання мітохондрій активна (транспортується більше 30% електронів), у бугаїв – нижча (26,3%), а у спермі чоловіків – низька (10,4%).

Після дії інгібітора термінальної ланки ланцюга дихання натрію азиду споживання кисню знижується у спермі чоловіків на 25,1%, кнурів – на 33,4% і бугаїв – на 20,0%. Частка ж кисню, що використовується цитохромоксидазою, від загальної кількості спожитого кисню спермою і послідовної дії інгібіторів гліколізу та NAD-залежної ланки становить, відповідно, у чоловіків – 12,2%, у кнурів – 10,6% і у бугаїв – 11,1%.

Величина азидрезистентного дихання, від загальної кількості спожитого кисню, у спермі чоловіків становить 40,8%, кнурів – 36,1% і бугаїв – 44,4%. При цьому від азидрезистентного споживання кисню на вільнорадикальне окиснення жирних кислот припадає у спермі чоловіків 25,0%, кнурів – 23,5% і бугаїв – 13,8%, що становить, відповідно, 10,2, 8,5 і 6,1% загальної кількості спожитого кисню. Встановлені особливості зумовлені, ймовірно, вищим вмістом ненасичених жирних кислот у сперміях чоловіків і кнурів, порівняно з бугаями, і, відповідно, підвищеним рівнем вільнорадикального окиснення їх [9].

Вільне окиснення займає від загальної кількості спожитого кисню у спермі чоловіків 30,6%, кнурів – 27,6% і бугаїв – 38,2%. Значний відсоток використаного кисню при вільному окисненні може вказувати на руйнування білкових компонентів як плазми сперми, так і сперміїв, або активування процесів спонтанної капацитації.

Оскільки спожитий кисень спермою використовується не тільки для ресинтезу АТФ, але й у процесах вільнорадикального окиснення і генерування $O_2^{\cdot-}$, то для встановлення участі СОД у забезпеченні функціонування ланцюга дихання мітохондрій сперміїв вивчали кореляційні зв'язки активності ензиму з інтенсивністю дихання сперми.

Встановлено, що для свіжоотриманих еякулятів бугаїв характерна висока активність СОД – $4,2 \pm 0,3$ МО/мг протеїну, а кнурів і чоловіків, відповідно, нижча на 2,4 ($4,1 \pm 0,6$ МО/мг протеїну) та 7,1% ($3,9 \pm 0,2$ МО/мг протеїну). Кореляційний аналіз показав, що в еякулятах бугаїв від менше 2,5 до 4,5 МО/мг протеїну СОД споживання кисню підвищується на 65,3% і за максимальної величини (більше 4,5 МО/мг протеїну) становить $10,6 \pm 1,4$ нг-атом $O/hv \times 0,1$ мл сперми, що вище вихідного значення більш ніж удвічі ($P < 0,01$, табл. 2). Аналогічно, щодо зростання активності СОД (від менше 2,5 до 4,5 МО/мг протеїну) і послідовної дії інгібіторів (NaF, аміталу, NaN_3 та Na_2EDTA) споживання кисню спермою більше в 2,7, 2,4, 4,5 та 4,8 рази і при максимальній активності (більше 4,5 МО/мг протеїну) становить $8,4 \pm 0,54$, $6,4 \pm 0,10$, $5,6 \pm 0,34$ та $4,8 \pm 0,11$ нг-атом $O/hv \times 0,1$ мл сперми, відповідно ($P < 0,001$). Зв'язок між активністю СОД та інтенсивністю дихання як без використання, так і за послідовної дії інгібіторів прямий середньої сили ($\eta = 0,501 - 0,568$), що може свідчити про безпосередню участь ензиму в регуляції генерації $O_2^{\cdot-}$, як окремими ланками дихального ланцюга мітохондрій статевих клітин, так і в плазмі сперми бугаїв.

У еякулятах чоловіків і кнурів від менше 2,5 до більше 4,5 МО/мг протеїну СОД характеризується зниженням, відповідно, на 19,6 та 40% ($P < 0,01$) інтенсивності дихання. При цьому у спермі чоловіків за 2,5–4,5 МО/мг протеїну СОД і використанні NaF та аміталу проявляється максимальна інтенсивність дихання ($7,1 \pm 0,88$ і $5,3 \pm 0,53$ нг-атом $O/hv \times 0,1$ мл сперми). Навпаки, за активності менше 2,5 та більше 4,5 МО/мг протеїну дихальна активність нижча, відповідно, на 50,7 і 33,9% та на 61,9 і 56,6% ($p < 0,05 - 0,01$). Водночас, за 2,5–4,5 МО/мг протеїну СОД і пригнічення активності цитохромоксидази та вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот (NaN_3 і Na_2EDTA) інтенсивність дихання низька ($1,5 \pm 0,35$ та $0,7 \pm 0,07$ нг-атом $O/hv \times 0,1$ мл сперми). Тоді ж як за менше 2,5 і

більше 4,5 МО/мг протеїну СОД споживання кисню, відповідно, в 1,9 та 3,4 і 1,7 та 2,7 разу вище. Кореляційне відношення за активністю СОД для інтенсивності споживання кисню спермою чоловіків, залежно від ймовірної ланки генерування $O_2^{\cdot-}$, $\eta=0,256-0,441$.

Таблиця 2

Зв'язок активності СОД з інтенсивністю споживання кисню спермою

Дихальна активність, нг-атом О/ (хв • 0,1мл С)	Еякуляти	СОД, МО / мг протеїну						η
		2,5 <		2,5–4,5		> 4,5		
		n	M±m	n	M±m	n	M±m	
сперми	чоловіків	9	5,1±0,25	11	4,5±0,47	10	4,1±0,47	0,320
	кнурів	3	5,0±0,27	6	4,3±0,51	3	3,0±0,41**	0,477
	бугаїв	11	5,2±0,66	17	8,6±0,69**	8	10,6±0,4**	0,501
з інгібіторами: NaF	чоловіків	6	3,5±0,75	15	7,1±0,88**	9	2,7±0,43	0,324
	кнурів	3	2,7±0,15	6	3,0±0,24	3	3,5±0,31	0,193
	бугаїв	6	2,2±0,15	9	5,9±0,33***	10	8,4±0,54***	0,527
амітал	чоловіків	6	3,5±0,56	15	5,3±0,53*	9	2,3±0,30	0,256
	кнурів	3	2,5±0,17	6	2,8±0,44	3	1,3±0,30*	0,205
	бугаїв	11	2,0±0,23	11	4,7±0,10***	8	6,4±0,10***	0,568
NaN ₃	чоловіків	6	2,8±0,74	15	1,5±0,35	9	2,6±0,57	0,359
	кнурів	3	3,1±0,54	6	2,0±0,48	3	1,5±0,09*	0,460
	бугаїв	10	0,8±0,34	10	3,6±0,16***	8	5,6±0,34***	0,529
Na ₂ ЕДТА	чоловіків	6	2,4±0,82	15	0,7±0,07	9	1,9±0,17	0,441
	кнурів	3	3,0±0,06	6	1,7±0,05***	3	0,5±0,04***	0,414
	бугаїв	9	0,6±0,17	11	2,9±0,16***	9	4,8±0,11***	0,513

Примітка. Різниця статистично вірогідна порівняно до мінімального значення показника: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

У спермі кнурів підвищення активності СОД за присутності інгібіторів гліколізу й НАД-залежної ланки ланцюга дихання мітохондрій (NaF і аміталу) слабо впливає на інтенсивність споживання кисню – сила зв'язку не перевищує $\eta=0,205$. Однак при зростанні з менше 2,5 до 4,5 МО/мг протеїну СОД і дії NaN₃ та Na₂ЕДТА дихальна активність сперми кнурів зменшується, відповідно, на 35,5 і 43,3% і при максимальному значенні (більше 4,5 МО/мг протеїну) становить 1,5±0,09 (P<0,05) і 0,5±0,04 нг-атом О/хв × 0,1 мл сперми (P<0,001). Зв'язок між активністю ензиму та споживанням кисню зворотний середньої сили ($\eta=0,414-0,460$). Очевидно, у спермі чоловіків і кнурів, на відміну від бугаїв, рівень супероксиданіон радикалів, утворених під час транспорту електронів і протонів у ланцюзі дихання мітохондрій статевих клітин, регулюється поряд з СОД, іншими, не ензиматичними ланками системи антиоксидантного захисту.

Таким чином, дихальна активність сперми чоловіків характеризується високою інтенсивністю аеробного гліколізу та вільнорадикального окиснення жирних кислот, активністю цитохромоксидази і низькою активністю НАД-залежної ланки дихального ланцюга мітохондрій – обмеженим використанням альтернативних субстратів у циклі трикарбонових кислот (ЦТК). Для еякулятів бугаїв властиві низькі величини активності аеробного гліколізу та вільнорадикального окиснення жирних кислот і помірні активності НАД-залежної й термінальної ланок ланцюга дихання мітохондрій. Сперма кнурів за інтенсивністю окисних процесів займає проміжне місце між еякулятами чоловіків та бугаїв і характеризується середніми величинами аеробного гліколізу, цитохромоксидази та вільнорадикального окиснення жирних кислот і високою активністю НАД-залежної ланки дихального ланцюга мітохондрій (використання в ЦТК альтернативних субстратів). Активність СОД проявляє прямий зв'язок середньої сили з інтенсивністю споживання кисню еякулятів бугаїв, а для сперми чоловіків і кнурів за підвищення активності ензиму характерне зниження інтенсивності дихання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробець Д. З., Кочешкова Н. С. Неплідність та еректильна дисфункція чоловіків: біохімічні та клінічні аспекти. Тернопіль: ТДМУ, 2008. 204 с.
2. Методы измерения дыхательной активности микросом / Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 59–60.
3. Плохинский Н. А. Биометрия. М.: МГУ, 1970. С. 53–60.
4. Чевари С. Н., Андян Т. А., Штрэнгер Я. И. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. 1991. № 10. С. 9–13.
5. Яблонський В. А., Хомин С. П., Завірюха В. І. та ін. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин. Львів: ТЗОВ ВФ Афіша, 2009. 218 с.
6. Aitken R. J., Baker H. W. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good // Hum. Reprod. 1995. Vol. 10. P. 1736–1739.
7. Baldi E. M., Bonaccorsi L., Forti G. Signal transduction pathways in human spermatozoa // J. Reprod. Immunol. 2002. Vol. 53. P. 121–131.
8. Baumber J., Ball B., Meyer J., Meyers S. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa // J. Androl. 2003. Vol. 24. N 4. P. 621–628.
9. Ford W. C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species // Human Reproduction. 2004. Vol. 10. N 5. P. 387 – 399.
10. Gavella M., Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men // Arch. Androl. 1992. Vol. 28. P. 135–141.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P.264–275.
12. Tunc O., Thompson J., Tremellen K. Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress // Int. J. Androl. 2010. Vol. 33. N 1. P. 13–21.

Стаття: надійшла до редакції 02.12.14

доопрацьована 17.02.15

прийнята до друку 27.02.15

FEATURES OF OXYGEN CONSUMPTION INTENSITY BY THE SEMEN OF MAMMALS AND ACTIVITY OF THE SUPEROXIDE DISMUTASE

N. Kuz'mina, D. Ostapiv

Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine

38, Stus St., Lviv 79034, Ukraine

e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

Oxidation processes in men, boar and bull ejaculates were studied. It was shown, that bull semen is characterized by higher oxygen consumption and SOD activity ($8,1 \pm 0,6$ ng-atom O/min $\times 0,1$ ml of semen and $4,2 \pm 0,3$ ME/mg of protein), compared to boar semen (correspondingly, $4,9 \pm 0,7$ i $4,7 \pm 0,2$ ng-atom O/min $\times 0,1$ ml of semen and $4,1 \pm 0,6$ i $3,9 \pm 0,2$ ME/mg of protein). Human semen respiratory activity is characterized high intensity of aerobic glycolysis and fatty acid free-radical oxidation, cytochrome oxydase activity and low activity of NADH-dehydrogenase. Bull ejaculates have low intensity of aerobic glycolysis and fatty acids free-radical oxidation, while NADH-dehydrogenase and cytochrome oxydase have not high indexes of activity. Oxidation processes in boar semen take medium

place between men and bull. Connection between SOD activity and respiration intensity of bull semen showed medium force ($\eta=0,501-0,568$). Men and boar semen can be characterized by lowering of respiration when enzymatic activity rises ($\eta=0,320-0,477$).

Keywords: respiration intensity, superoxide dismutase activity, respiration inhibitors, semen.

ОСОБЕННОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ СПЕРМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Н. Кузьмина, Д. Остапів

*Институт биологии животных НААН Украины
ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина
e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua*

Проведено исследование окислительных процессов в эякулятах мужчин, хряков и быков. Установлено, что высшей интенсивностью потребления кислорода и активностью СОД характеризуется сперма быков ($8,1\pm 0,6$ нг-атом О/мин $\times 0,1$ мл спермы и $4,2\pm 0,3$ МО/мг протеина) и меньшей – мужчин и хряков (соответственно, $4,9\pm 0,7$ и $4,7\pm 0,2$ нг-атом О/мин $\times 0,1$ мл спермы, $4,1\pm 0,6$ и $3,9\pm 0,2$ МО/мг протеина). Дыхательная активность спермы мужчин характеризуется высокой интенсивностью аэробного гликолиза и свободнорадикального окисления жирных кислот, активностью цитохромоксидазы и низкой активностью NADH-дегидрогеназы. Для эякулятов быков свойственны низкая интенсивность аэробного гликолиза и свободнорадикального окисления жирных кислот, а также низкая активность NADH-дегидрогеназы и цитохромоксидазы. Сперма хряков по интенсивности окислительных процессов занимает промежуточное место между эякулятами мужчин и быков. Связь между активностью СОД и интенсивностью дыхания спермы быков прямая средней силы ($\eta=0,501-0,568$). Для спермы мужчин и хряков характерно снижение интенсивности дыхания при повышении активности энзима ($\eta=0,320-0,477$).

Ключевые слова: интенсивность дыхания, активность супероксиддисмутазы, ингибиторы дыхания, сперма.