

АКТИВНІСТЬ ТА ІЗОФОРМИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ У ТКАНИНАХ РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ

Н. Кузьміна, Д. Остапів

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

Вивчали активність супероксиддисмутази і вміст її ізоформ у сім'яниках, придатку й епідидимальних сперміях статевозрілих самців щурів. Найбільшою СОД-активністю характеризується тканина сім'яника, меншою тканина придатка і найменшою – епідидимальні спермії. Електрофорезом у 10% поліакриламідному гелі та специфічним фарбуванням у всіх досліджених зразках виявлено 5 смуг білків зі СОД-активністю (S1–S5). Встановлено, що ізоферментний спектр СОД характеризується тканинною специфічністю та залежить від фізіологічних і функціональних особливостей тканини репродуктивних органів самців і сперміїв.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, ізоформи, репродуктивні органи, спермії, електрофорез.

Фізіологія репродуктивної системи самців тісно пов'язана з інтенсивним окисним метаболізмом – синтезом і використанням АТФ, утворенням і нагромадженням активних форм кисню (АФК) та їх утилізацією. Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується багатокомпонентною антиоксидантною системою, ключову роль у якій відіграє супероксиддисмутаза (СОД) [9]. У репродуктивних органах самців, як і в інших тканинах, ензим існує у трьох генетично зумовлених формах – мітохондрійній, цитозольній і позаклітинній [11]. Інтенсивність утворення та знищення АФК у репродуктивній системі самців проявляє особливості. Так виявлено, що у сім'янику активність СОД вища порівняно з придатком, а у придатку сім'яника, його головці, вища, порівняно з хвостом [10]. Найнижча активність вказаного ферменту встановлена в еякуляті. Однак зниження активності СОД не завжди може бути маркером послабленого антиоксидантного захисту й, відповідно, погіршення фізіологічних якостей статевих клітин. Це зумовлено тим, що вміст окремих ізоформ ензиму з неоднозначною силою корелює з виживанням сперміїв в еякуляті [3]. Отже, для встановлення особливостей функціонування репродуктивних органів самців важливим є не тільки констатування змін загальної активності СОД, але й перерозподіл її ізоформ у процесі сперміогенезу та дозрівання статевих клітин, а після еякуляції – їх існування.

Мета роботи – вивчити активність СОД та її ізоформи залежно від тканини репродуктивної системи самців щурів.

Матеріали та методи

Досліди проводили на статевозрілих самцях щурів (вік 5–6 місяців). Тварин забивали шляхом декапітації під хлороформним наркозом. Після забою відбирали сім'яники та придатки сім'яників, з яких вимивали спермії 0,9% розчином натрію хлориду. Тканини гомогенізували в гомогенізаторі Поттера в холодному (4°C) 0,15M Na/K фосфатному буфері рН 7,4 (1 г тканини на 2 мл буфера) при 6000 об/хв протягом 2 хв. Гомогенат центрифугували 15 хв при 8000 об/хв. У супернатанті та в суспензії сперміїв визначали вміст загального

білка [9] і активність СОД [4]. Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі (ПААГ). Проби для електрофорезу готували за схемою: зразки розводили 1:4 Трис-гліциновим буфером і додавали 0,05 мл 40% сахарози до 0,1 мл зразка. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (концентрація білка 50–100 мкг). Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp і Fridovich [5] у нашій модифікації [1]: після електрофорезу ПААГ пластини занурювали в розчин, що містив 1,23 мМ нітросинього тетразолію (НСТ) в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, (рН 7,8) на 15 хв в темноті при кімнатній температурі і тричі промивали дистильованою водою. Потім заливали інкубаційним середовищем, що містило 28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавіну в 0,15 М Na/K фосфатному буфері (рН 7,8). Інкубували в темноті протягом 20 хв. Після цього пластини гелю промивали дистильованою водою і витримували 7 хв під ультрафіолетом для генерації $O_2^{\cdot-}$ рибофлавіном. У результаті фотохімічної реакції відновлення НСТ до нітроформазау супероксидними аніонрадикалами пластини набували темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими внаслідок перетворення супероксиданіонрадикалів СОД.

Результати і їхнє обговорення

У досліджених зразках тканин сім'яника і придатка й епідидимальних сперміях щурів виявлена активність СОД (табл. 1).

Таблиця 1

Активність супероксиддисмутази в репродуктивних органах самців щурів, n=21; M±m

Активність СОД	Тканини		
	сім'яника	придатка	епідидимальні спермії
МО/мг білка	18,2±2,59	11,9±0,89*	9,7±0,83**

Примітка. * – p<0,05; ** – p<0,01 різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною сім'яника.

Причому найвищою активністю характеризується тканина сім'яника (18,2±2,59 МО/мг білка), меншою – придатка (на 34,6%) і найменшою – епідидимальні спермії (на 46,7%).

Така закономірність змін активності СОД зумовлена тим, що у тканині сім'яника, де проходить сперміогенез, у сперміях деконденсований хроматин і супероксиданіон радикали ($O_2^{\cdot-}$) здатні руйнувати вуглецеві зв'язки між основами, ініціювати процес пероксидації ДНК [13] і розриви її спіралі [14]. Отже, збереженість і захист генетичного матеріалу у тканині сім'яника забезпечується високим рівнем активності СОД. У придатку сім'яника, де незрілі спермії перетворюються на зрілі гамети, СОД виконує регуляторну роль, оскільки $O_2^{\cdot-}$ разом з іншими чинниками беруть участь у збільшенні вмісту внутрішньоклітинного цАМФ і запуску каскаду реакцій фосфорилування тирозину, що забезпечує капацитацію й акросомну реакцію та здатність запліднювати ооцит. У сперміїв з епідидиміса понижений антиоксидантний захист, зумовлений фізіологічними особливостями підготовки статевих клітин до запліднення ооцита (процесу капацитації) [7], для яких характерний підвищений рівень окиснення поліненасичених жирних кислот (ПЖК) ліпідів цитоплазматичних мембран [8] та інтенсивна генерація $O_2^{\cdot-}$ ланками ланцюга дихання мітохондрій [6].

Тканини репродуктивних органів і спермії відрізняються не тільки різною СОД-активністю, але й вмістом ізоформ ферменту. У тканинах сім'яника, придатка і епідидимальних сперміях щурів виявлено п'ять основних ізоформ СОД, які, залежно від швидкості руху в ПААГ, позначили від найменш рухливої до максимально рухливої: S1, S2, S3, S4 і S5 (рис. 1).

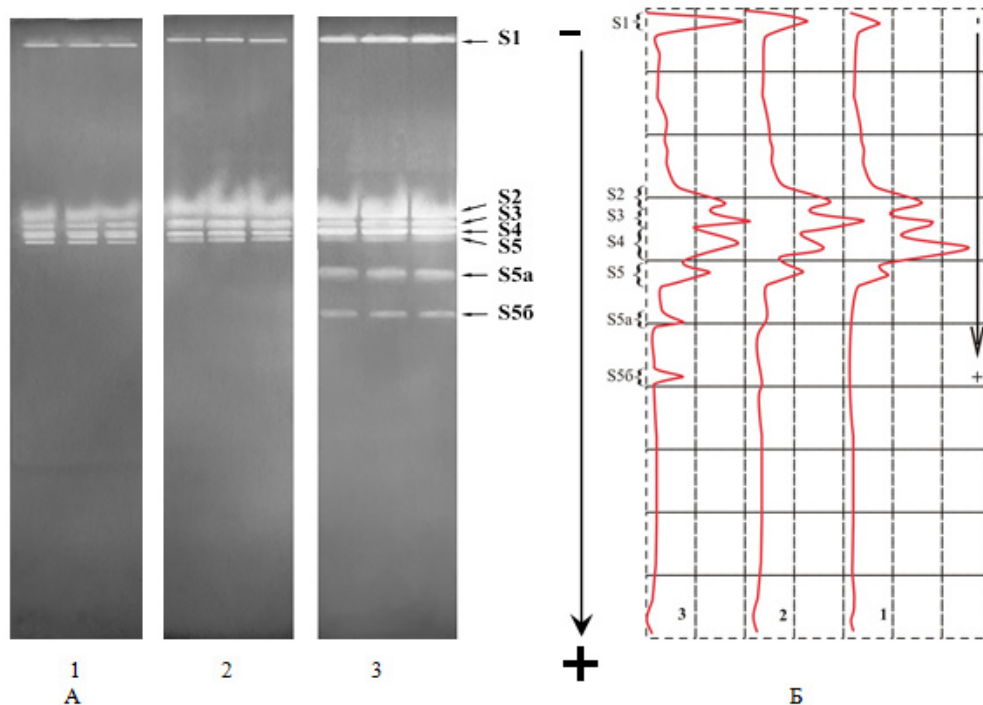


Рис. 1. Ізоферменти СОД тканин репродуктивних органів і спермійв щурів: А – копії фореграм (пластини 10% ПААГ; фарбування нітросинім тетразолієм); Б – денситограма білків супероксиддисмутази; 1 – епідидимальні спермії; 2 – придаток сім'яника; 3 – сім'яник; S1–S5 – ізоформи ферменту.

Крім того, у тканині сім'яника нижче S5-фракції СОД, безпосередньо після фарбування, проявляються ще дві міnorні ізоформи, які характеризуються вищою електрофоретичною рухливістю і меншою інтенсивністю проявлення, яке з часом зникає, на відміну від інших фракцій білків ферменту. Тобто у тканині сім'яника щурів наявні білки зі СОД-активністю, які швидко втрачають свою каталітичну здатність.

Аналізом вмісту ізоформ ферменту встановлено, що у тканині сім'яника найбільше S4-ізоформи – $36,7 \pm 1,91\%$; менше і майже однаковий вміст S2-, S3- і S5-ізоформ ($18,0 \pm 3,27$, $19,3 \pm 3,98$ і $15,7 \pm 2,15\%$) та найменше – S1-, S5a- і S5b-ізоформ ($6,2 \pm 1,20\%$; $2,2 \pm 0,03$ і $1,9 \pm 0,01\%$) (табл. 2). У тканині придатка, порівняно зі сім'яником, вміст S3-ізоформи вищий на $17,9\%$, а S4- і S5- менший, відповідно, на $7,9$ і $4,9\%$. За вмістом S1- і S2-ізоформ досліджені тканини не відрізнялись. Для ізоферментів СОД епідидимальних спермійв характерний високий вміст S4-ізоформи, що більше на $11,2\%$, ніж у сім'янику і на $19,1\%$, ніж у придатку, а вміст S5-ізоформи, навпаки, менший на $10,0$ і $5,1\%$, відповідно. Вміст S3-ізоформи СОД спермійв нижчий на $11,7\%$ порівняно з тканиною придатка, а S1-ізоформи менший на $3,4\%$ від тканини сім'яника. Вміст S2-ізоформи у сперміях майже однаковий, порівняно з досліджуваними тканинами.

Подібний склад активних білків СОД встановлено у спермі інших видів тварин (бугая, кнура) та чоловіка [2]. При цьому переважання S4-ізоформи у загальному спектрі білків ферменту впливає на фізіологічні характеристики спермійв: її вміст проявляє позитивну, середньої сили кореляцію з виживанням статевих клітин у свіжоотриманих еякулятах [3].

Таблиця 2

Вміст білків СОД у тканинах репродуктивних органів і сперміях щурів, n=9; M±m

СОД	Вміст ізоформ, %		
	тканина		епідидимальні спермії
	сім'яник	придаток	
S1	6,2±1,20	4,7±1,46	2,9±0,46*
S2	18,0±3,27	18,5±2,53	18,0±3,36
S3	19,3±3,98	37,2±2,17*	25,5±3,97#
S4	36,7±1,91	28,8±2,10*	47,9±1,52***
S5	15,7±2,15	10,8±0,73*	5,7±1,97***
S5a	2,2±0,03	–	–
S5b	1,9±0,01	–	–

Примітка. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною сім'яника; # – $p < 0,05$ різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною придатка.

Із результатів аналізу загальної активності СОД і відсоткової частки кожної ізоформи ферменту в досліджуваному матеріалі репродуктивної системи самців щурів впливає, що активність S4-ізоформи найвища у тканині сім'яника (6,7±0,34 МО/мг білка), нижча на 31,3% в епідидимальних сперміях і найменша у тканині придатка (3,4±0,12 МО/мг білка) (табл. 3). S3-ізоформа, навпаки, проявляє найбільшу активність у тканині придатка (4,4±0,27 МО/мг білка) і меншу в сім'янику й епідидимальних сперміях, відповідно, на 20,4 і 40,1%. Активність S1-, S2- і S5-ізоформ знижується від сім'яника до придатка та епідидимальних сперміїв з 1,1±0,42, 3,3±0,26 і 2,9±0,13 МО/мг білка, відповідно, на 45,5, 33,3 і 55,1% – в придатку та 72,7, 48,5 і 79,3% – в епідидимальних сперміях.

Таблиця 3

Активність окремих ізоформ СОД у тканинах репродуктивних органів і сперміях щурів, n=9; M±m

Ізоформи СОД	Активність супероксиддисмутази, МО/мг білка		
	тканина		епідидимальні спермії
	сім'яник	придаток	
S1	1,1±0,42	0,6±0,07***	0,3±0,02***
S2	3,3±0,26	2,2±0,11*	1,7±0,10*
S3	3,5±0,17##	4,4±0,27	2,5±0,27##
S4	6,7±0,34	3,4±0,12***	4,6±0,19***
S5	2,9±0,13	1,3±0,09***	0,6±0,04***
S5a	0,4±0,01	–	–
S5b	0,3±0,01	–	–

Примітка. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною сім'яника; ## – $p < 0,01$ різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною придатка.

Отже, поряд із різницею в загальній активності СОД встановлені відмінності вмісту й активності окремих ізоформ ферменту свідчать про існування тканинної специфічності білків СОД, зумовленої функціональними особливостями досліджених тканин. Оптимальний захист сперміїв від $O_2^{\cdot -}$ у процесі їх диференціації та дозрівання забезпечується активністю різних ізоформ СОД, що підтверджують встановлені різниці в ізоферментному спектрі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д. Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в різних органах і крові корів // Біологія тварин. 2008. № 12. С. 423–429.
2. Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д., Гулеюк Н. Л., Гуменецький І. Є Видові та індивідуальні особливості ізоферментів супероксиддисмутази сперми // Укр. біохім. журн. 2010. № 82. С. 85–86.
3. Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д., Яремчик І. М. Ізоферментний спектр супероксиддисмутази в процесі інкубування еякулятів бугаїв // Біологія тварин. 2010. № 12. С. 423–429.
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. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. Vol. 44. P. 276–287.
6. Dalvit G. C., Miragaya M. H., Chaves M. G. Energy requirement of bovine spermatozoa for *in vitro* capacitation // Theriogenol. 1995. Vol. 44. N 7. P. 1051–1058.
7. Griveau J. F., Renard P., LeLannou D. Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process // Int. J. of Androl. 1995. Vol. 18. P. 67–74.
8. Lewis S. E., McKelvey-Martin V. J., Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay // Mol. Human. Reprod. 1996. Vol. 13. P. 613–619.
9. 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.
10. Marnett L. J. Oxyradicals and DNA damage // Carcinogenesis. 2000. Vol. 21. P. 361–370.
11. Peeker R. Abramsson L., Marklund S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and Spermatozoa // Molecular Human Reproduction. 1997. Vol. 3. N 12. P. 1061–1066.
12. Potts R. J., Jefferies T. M., Notarianni L. J. Antioxidant capacity of the epididymis // Human Reproduction. 1999. Vol. 14. P. 2513–2516.
13. Storey B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa // Mol. Human. Reprod. 1997. Vol. 3. P. 203–213.
14. Thomson L. K., Fleming S. D., Aitken R. J. et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis // Hum. Reprod. 2009. Vol. 24. P. 2061–2070.

Стаття: надійшла до редакції 28.02.11

доопрацьована 07.06.11

прийнята до друку 17.06.11

THE ACTIVITY AND ISOFORMS OF SUPEROXIDEDISMUTASE IN TISSUES OF REPRODUCTIVE ORGANS OF RATS**N. Kuzmina, D. Ostapiv**

*Institute of Animal Biology UAAS
38, V. Stus St., Lviv 79034, Ukraine
e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua*

The activity of superoxidodismutase, the content of its isoforms in testis, epididimis, and in epididimal spermatozoa of pubescent rat males. The activity of SOD was the highest in tissues of testis, lower in tissues of epididimis, and the lowest in epididimal spermatozoa. By means of electrophoresis in 10% polyacrylamid gel and specific staining in all studied samples were found 5 stripes of proteins with the activity of SOD (S1–S5). It is found that spectrum of isoferments SOD characterises of tissue specificity and depends on physiological and functional features of tissues of reproductive mail organs and spermatozoa.

Key words: superoxidodismutase, isoforms, reproductive organs, spermatozoa, electrophoresis.

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФОРМЫ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ТКАНЯХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ КРЫС**Н. Кузьмина, Д. Остапів**

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

Изучали активность супероксиддисмутаза и содержание ее изоформ в семенниках, придатке и эпидидимальных спермиях половозрелых самцов крыс. Наибольшей СОД-активностью характеризуется ткань семенника, меньшей придатка и самой низкой – эпидидимальные спермии. Электрофорезом в 10% полиакриламидном геле и специфическим окрашиванием во всех исследованных образцах выявлено 5 полос белков с СОД-активностью (S1–S5). Установлено, что изоферментный спектр СОД характеризуется тканевой специфичностью и зависит от физиологических и функциональных особенностей тканей репродуктивных органов самцов и спермиев.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, изоформы, репродуктивные органы, спермии, электрофорез.