

АКТИВНІСТЬ ТА ВМІСТ ІЗОФОРМ АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ В ЕЯКУЛЯТАХ САМЦІВ І ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ

Н. Кузьміна¹, Д. Остапів¹, І. Яремчук¹,
Н. Гулеюк², І. Гуменецький²

¹Інститут біології тварин НААН

²Інститут спадкової патології НАМН України

Вивчали кореляції між активністю і вмістом ізоформ аспартатамінотрансферази та виживанням спермій у еякулятах самців. У спермі чоловіків, кнурів та бугаїв активність ферменту становить, відповідно, $70,0 \pm 5,1$; $53,3 \pm 8,8$ і $63,2 \pm 6,3$ нмоль/хв×мг білка. Фермент проявляється двома ізоформами (АСТ1 та АСТ2), які відрізняються між собою електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю зафарбування. Між активністю ферменту та тривалістю виживання спермій чоловіка існує позитивна сильна ($\eta = 0,742$), спермій бугая — середньої сили ($\eta = 0,330$), а спермій кнура негативна ($\eta = 0,532$) кореляція. При цьому, за вмістом АСТ1-ізоформи для виживання спермій у спермі чоловіка і бугая існує позитивний зв'язок середньої сили ($\eta = 0,657$ і $0,639$), а кнура — сильний ($\eta = 0,769$). Кореляційне відношення за вмістом АСТ2-ізоформи для тривалості виживання спермій негативне сильне у спермі чоловіка та кнура ($\eta = 0,740$ і $0,722$), а бугая — середньої сили ($\eta = 0,586$).

Ключові слова: АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗА, АКТИВНІСТЬ, ІЗОФОРМИ, ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ, СПЕРМА

Аспартатамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.1., АСТ) каталізує обернене перенесення аміногрупи (трансамінування) від L-аспартату на α -кетоглутарат з утворенням оксалоацетату і L-глутамату. АСТ міститься в більшості тканин ссавців, є внутрішньоклітинним ферментом та існує у вигляді двох ізоформ — цитозольної і мітохондріальної, які відрізняються між собою за фізико-хімічними властивостями [1]. АСТ виконує роль зв'язуючої ланки між білковим і енергетичним обмінами та приймає участь в транспорті відновних еквівалентів в мітохондріальній матрикс [2]. Активність ферменту встановлена у спермі ссавців [3–5]. При цьому виявлено, що в плазмі сперми активність АСТ позитивно корелює із кількістю спермій з ушкодженою акросомою і негативно — з відтворювальною здатністю плідників [6–8]. Тому вивчення активності і вмісту ізоформ ферменту в еякулятах різних видів самців та встановлення зв'язків досліджуваних біохімічних показників з виживанням статевих клітин є актуальним для оцінювання фізіологічної якості спермій.

Мета досліджень — вивчити кореляції між активністю і вмістом ізоформ АСТ в еякулятах та тривалістю виживання спермій.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на базі Інституту біології тварин НААН, Львівського науково-виробничого центру «Західплемресурси» та ДУ «Інститут спадкової патології» НАМН України. Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв ($n = 60$), кнурів ($n = 18$) та чоловіків ($n = 45$). У спермі досліджували активність (нмоль/хв×мг білка) [9], ізоформи АСТ (%) і виживання спермій (год) при 2–4 °С до припинення прямолінійного поступального руху. Для виявлення ізоформ АСТ проводили електрофорез у 7,5 % поліакріламідному гелі (ПААГ). Проби для електрофорезу готували: зразки розводили 1:1 0,005 М Трис-гліциновим буфером, рН 8,3 і додавали 0,05 мл 40 % сахарози до 0,1 мл зразка. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (концентрація білка 100 мкг). Після електрофорезу виявляли ізоформи АСТ шляхом фарбування гелю [10] в нашій модифікації: пластини ПААГ інкубували 30 хв при температурі 37 °С у середовищі, що містило 0,5 мг/мл пірідоксаль-5-фосфату, 30 мг/мл альбуміну, 0,2 М L,D-аспарагінової кислоти, 0,1 М α -кетоглутарату та 150 мг діазолію синього С у 50 мл 0,2 М Na/K фосфатного буфера (рН 7,5). Після фарбування гелі фіксували 20 хв у 7 % розчині трихлороцтової кислоти, відмивали залишки незв'язаної фарби і зберігали в 7 % розчині оцтової кислоти. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за

М. О. Плохінським [11] з використанням персонального комп'ютера й програмного забезпечення Clipper.

Результати й обговорення

Встановлено, що активність АСТ залежить від виду самців. Так, активність ферменту низька у спермі кнура — $53,3 \pm 8,8$ нмоль/хв×мг білка, вища на 18,5 % в еякулятах бугая та найвища у чоловіка — $70,0 \pm 5,1$ нмоль/хв×мг білка (табл. 1).

Таблиця 1

Активність та вміст ізоформ аспартатамінотрансферази у спермі

Досліджувані показники	Самець					
	чоловік		кнур		бугай	
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
АСТ, нмоль/хв×мг білка	45	$70,0 \pm 5,1$	18	$53,3 \pm 8,8$	58	$63,2 \pm 6,3$
АСТ1	33	$59,2 \pm 10,1$	16	$51,6 \pm 9,0^*$	42	$51,7 \pm 14,3^*$
АСТ2	33	$40,8 \pm 10,1$	16	$48,4 \pm 9,0^*$	42	$48,3 \pm 14,3^*$

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно зі спермою чоловіка, * — $p < 0,05$

Отже, в еякулятах чоловіка інтенсивність переамінування амінокислот (постачання субстратів у цикл трикарбонових кислот мітохондрій спермійв) переважає сперму бугая та кнура.

В еякулятах самців існує дві ізоформи АСТ, які залежно від електрофоретичної рухливості у 7,5 % ПААГ позначили: АСТ1 (менш рухлива) та АСТ2 (більш рухлива; рис.).

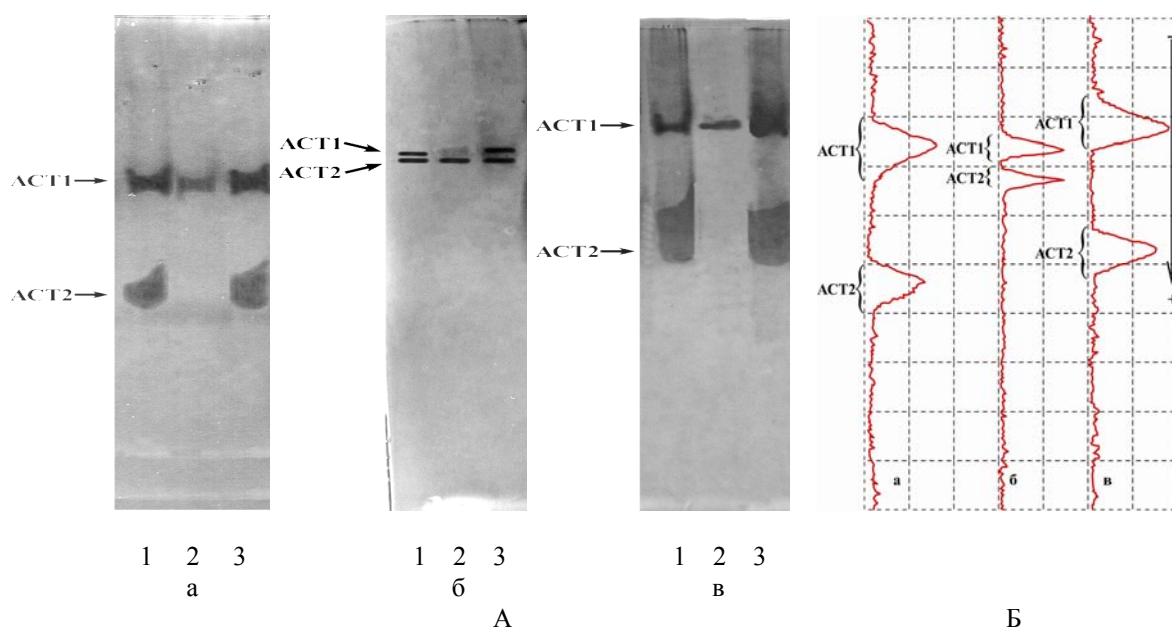


Рис. Білки АСТ сперми: А — копії фореграм; Б — денситограма білків АСТ; а — чоловіка; б — кнура; в — бугая; 1 — цільна сперма; 2 — плазма сперми; 3 — спермії; АСТ1, АСТ2 — ізоформи ферменту

Видові відмінності спектру ізоферментів АСТ проявляються різною швидкістю руху у процесі електрофоретичного розділення білків, інтенсивністю та площею зафарбованих смуг. Зокрема, у спермі чоловіка ізоформи ферменту характеризуються найвищою рухливістю в електричному полі, нижчою — у кнура і найнижчою — у бугая. Крім того, ізоформа АСТ2 у еякулятах чоловіка і бугая має вищу електрофоретичну рухливість, порівняно зі спермою кнура.

Встановлено що, фермент, незалежно від виду самця, локалізований як у рідкій частині еякуляту, так і статевих клітинах (рис. 1). При цьому, у плазмі сперми чоловіка і бугая проявляється АСТ1-, а у кнура — АСТ2-ізоформи. У сперміях, як і цільній спермі самців виявлені АСТ1- і АСТ2-ізоформи. Оскільки АСТ є внутрішньоклітинним ферментом, виявлені ізоформи у плазмі сперми (чоловіка і бугая — АСТ1 і кнура — АСТ2), очевидно, мають цитоплазматичне походження.

Виявлені відмінності спектру ізоферментів АСТ при візуальному оцінюванні електрофореграм підтверджуються різним вмістом окремих ізоформ у загальному спектрі активних білків ферменту (табл. 1). Аналіз вмісту ізоформ АСТ свідчить про вищу величину значення АСТ1-ізоформи у еякулятах чоловіка ($59,2 \pm 10,10\%$) і нижчу на $7,5\text{--}7,6\%$ у кнура та бугая ($p > 0,05$) і, навпаки, у других — вищий вміст АСТ2-ізоформи ($48,3\text{--}48,4\%$) і нижчий у чоловіка на $7,5\text{--}7,6\%$ ($p > 0,05$). Таким чином, для сперми самців характерні ізоформи ферменту, які відрізняються за рухливістю в електричному полі і площею зафарбування. При цьому, у еякулятах самців проявляються дві ізоформи АСТ. Причиною відмінностей спектру ізоформ є видова належність та індивідуальні особливості самців. Ізоформа АСТ1 у спермі чоловіка і бугая та АСТ2 — у кнура цитоплазматичного походження.

Вивченням залежності виживання сперміїв від активності ферменту в еякулятах самців виявлено неоднозначну кореляцію як за напрямком, так і силою. Так, за активності АСТ менше $50,0$ нмоль/хв×мг білка величина фізіологічного показника у еякулятах чоловіка і бугая низька, відповідно, $51 \pm 6,6$ і $93 \pm 13,3$ год, а у кнура — висока — $148 \pm 12,1$ год (табл. 2).

Таблиця 2

Вживання сперміїв у зв'язку з активністю аспартатамінотрансфери у еякулятах самців

Еякуляти	Активність АСТ, нмоль/хв×мг білка						η
	50,0 <		50,0–70,0		> 70,0		
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	
	Вживання спермійв, год						
чоловік	8	51±6,6	11	76±7,4*	15	121±8,9***	0,742
кнур	5	148±12,1	7	102±9,1*	3	96±1,9**	0,532
бугай	7	93±13,3	23	114±4,6	18	121±7,0	0,330

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

Підвищення активності ферменту до $70,0$ нмоль/хв×мг білка збільшує виживання сперміїв на 25 год ($32,9\%$; $p < 0,05$) у спермі чоловіка і на 21 год ($18,5\%$) у бугая та знижує на 46 год ($31,1\%$; $p < 0,05$) - у кнура. За активності ферменту більше $70,0$ нмоль/хв×мг білка в еякулятах чоловіка і бугая виживання сперміїв однаково високе (121 год), а у кнура — найнижче ($96 \pm 1,9$ год). Різниця між мінімальними та максимальними величинами виживання сперміїв у спермі чоловіка — $67,9\%$ ($p < 0,001$), у бугая — $23,2\%$ і у кнура — $35,2\%$ ($p < 0,01$). Кореляційне відношення за активністю АСТ для виживання сперміїв у спермі чоловіка позитивне сильне ($\eta = 0,742$), бугая — позитивне середньої сили ($\eta = 0,330$), а кнура — негативне ($\eta = 0,532$).

Отже, у спермі (сперміях) чоловіка і бугая за підвищення активності АСТ зростає інтенсивність процесів переамінування, що забезпечує збільшення часу виживання статевих клітин. Однак, у спермі кнура активування АСТ призводить до зниження величини фізіологічного показника.

При аналізі кореляцій між вмістом ізоформ АСТ та виживанням статевих клітин встановлено, що АСТ1-ізоформа проявляє позитивний зв'язок з величинами значень фізіологічного показника у спермі. Так, за вмісту менше $30,0\%$ ізоформи виживання сперміїв у еякулятах чоловіка — $66 \pm 7,5$ год, кнура — $90 \pm 7,0$ год і бугая — $54 \pm 13,0$ год (табл. 3).

Таблиця 3

Зв'язок вмісту ізоформ АСТ з виживанням сперміїв

Еякуляти	Вміст АСТ1-ізоформи, %						η
	30,0 <		30,0–60,0		> 60,0		
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	
	Виживання спермійв, год						
чоловік	5	66±7,5	12	98±10,9*	15	136±10,8**	0,657
кнур	8	90±7.0	3	120±11,3*	4	168±10,7***	0,769

бугай	4	54±13,0	25	115±5,1***	9	130±4,5***	0,639
<i>Вміст АСТ2-ізоформи, %</i>							
-		30,0 <		30,0–60,0		> 60,0	-
чоловік	12	125±9,0	12	74±7,1***	8	60±8,4**	0,740
кнур	6	148±12,0	3	128±6,5	6	80±4,6***	0,722
бугай	4	132±3,0	25	118±5,1*	9	73±11,0***	0,586

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

Підвищення вмісту до 60,0 % АСТ1 збільшує виживання статевих клітин на 32 год (32,7 %; $p < 0,05$) у спермі чоловіка, на 30 год (25,0 %; $p < 0,05$) кнура і на 61 год (53,1 %; $p < 0,001$) у бугая. За вмісту більше 60,0 % ізоформи величина фізіологічного показника найвища — 136±10,8 год у чоловіка, 168±10,7 год — у кнура і 130±4,5 год — у бугая. Кореляційне відношення за вмістом АСТ1-ізоформи для виживання спермійв позитивне у свіжоотриманій спермі чоловіка і бугая середньої сили ($\eta = 0,657$ і $0,639$), а кнура — сильне ($\eta = 0,769$).

На противагу АСТ1-ізоформі, підвищення вмісту АСТ2-ізоформи в спермі самців характеризує зменшення виживання спермійв. Зокрема, за вмісту менше 30 % ізоформи величина фізіологічного показника висока у еякулятах: чоловіка — 125±9,0 год, кнура — 148±12,0 год і бугая — 132±3,0 год. Збільшення вмісту до 60,0 % АСТ2-ізоформи в спермі зменшує тривалість виживання статевих клітин на 51 год (40,8 %; $p < 0,001$) в еякулятах чоловіка, на 20 год (13,6 %) — у кнура і на 14 год (10,7 %; $p < 0,05$) — у бугая. При вмісті більше 60,0 % ізоформи виживання спермійв ще знижується на 14 год (19,0 %) у спермі чоловіка, на 48 год (37,5 %; $p < 0,001$) у кнура і на 45 год (38,2 %; $p < 0,001$) у бугая та становить, відповідно, 60±8,4; 80±4,6 і 73±11,0 год. Кореляційне відношення за вмістом АСТ2-ізоформи для виживання спермійв негативне у свіжоотриманій спермі чоловіка і кнура — сильне ($\eta = 0,740$ і $0,722$), а бугая — середньої сили ($\eta = 0,586$).

Отже, підвищення вмісту цитозольної ізоформи (АСТ1) у статевих клітинах чоловіка і бугая, очевидно, зумовлює збільшення вмісту оксалоацетату, субстрату цитозольної малатдегідрогенази, надходження в мітохондрії малату та глутамату з цитозоллю і активування, відповідно, транспорту відновних еквівалентів в цикл трикарбонових кислот (ЦТК) через малат-аспартатний шунт, що забезпечує підвищення виживання спермійв. У спермі кнурів зниження величини фізіологічного показника за підвищення вмісту цитозольної ізоформи ферменту (АСТ2), свідчить про втрату мітохондріями субстрату окиснення (α -кетоглутарату) і, відповідно, зниження активності ЦТК та ресинтезу АТФ. Очевидно, в сперміях кнура задіяні альтернативні шляхи надходження відновних еквівалентів в мітохондрії.

Підвищення вмісту мітохондріальної ізоформи (АСТ2) у сперміях чоловіка і бугая зумовлює відтік субстратів з ЦТК (аспартату і α -кетоглутарату) і, відповідно, зростання дефіциту АТФ для забезпечення поступального руху спермійв та зниження тривалості виживання статевих клітин. У кнура, підвищення виживання спермійв за збільшення АСТ1 (мітохондріальної ізоформи) вказує на здатність мітохондріального ферменту приймати участь в активуванні α -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу, перетворюючи глутамат в α -кетоглутарат, і тим самим, забезпечувати ефективне функціонування ЦТК.

Таким чином, встановлені зв'язки між тривалістю виживання спермійв, активністю та вмістом ізоформ АСТ в еякулятах самців свідчать про участь ферменту в забезпеченні енергією статевих клітин для існування, а досліджені біохімічні показники є критерієм їх фізіологічної якості.

Висновки

1. Активність АСТ в еякулятах самців характеризується видовою специфічністю: найвища у чоловіка (70,0±5,10 нмоль/хв×мг білка), нижча у бугая (63,2±6,3 нмоль/хв×мг білка) та низька у кнура (53,3±8,8 нмоль/хв×мг білка).

2. У спермі самців виявлено дві ізоформи АСТ, які відрізняються між собою електрофоретичною рухливістю у ПААГ, інтенсивністю зафарбування та різним вмістом у загальному спектрі активних білків ферменту.

3. За підвищення активності АСТ в еякулятах чоловіка і бугая збільшується тривалість виживання статевих клітин ($\eta = 0,742$ і $0,330$), а в кнура величина фізіологічного показника знижується ($\eta = 0,532$).

4. Збільшення вмісту АСТ1-ізоформи у свіжоотриманій спермі чоловіка і бугая позитивно, з середньою силою корелює з виживанням сперміїв ($\eta = 0,657$ і $0,639$), а в кнура — негативно, сильно ($\eta = 0,769$).

5. За вмістом АСТ2-ізоформи для виживання сперміїв існує негативна сильна кореляція у спермі чоловіка і кнура ($\eta = 0,740$ і $0,722$), а бугая — середньої сили ($\eta = 0,586$).

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати можуть бути використані при розробці тест-систем для визначення запліднювальної здатності сперміїв.

N. Kuzmina, D. Ostapiv, I. Yaremchuk, N. Huleyuk, I. Humenetskiy

ACTIVITY AND CONTENT OF ISOFORMS OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE IN MALE EJACULATES AND SPERMATOZOA SURVIVAL

S u m m a r y

Correlation between activity and content of aspartate aminotransferase isoforms and spermatozoa survival in ejaculates were studied. In human, boar and bull sperm the activity of enzyme indexes, respectively, $70,0 \pm 5,1$; $53,3 \pm 8,8$ і $63,2 \pm 6,3$ nmol/min*mg protein. The enzyme manifests in two isoforms (AST1 та AST2), that differ by electrophoretic mobility and intensity of color. Between the activity of enzyme and time of human spermatozoa survival exists positive strong ($\eta = 0,742$), bull — medium strength ($\eta = 0,330$), and boar — has negative ($\eta = 0,532$) correlation. Thus, between the content of AST1-isoform and the survival of man and bull spermatozoa exists a positive relationship of medium power ($\eta = 0,657$ and $0,639$), and boar — strong ($\eta = 0,769$). Correlation ratio between the content of AST2-isoform and the survival of man and boar spermatozoa is strong negative ($\eta = 0,740$ and $0,722$), and bull — medium power ($\eta = 0,586$).

Н. Кузьміна, Д. Остапів, І. Ярмчук Н. Гулеюк, І. Гуменецький

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОФОРМ АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В ЭЯКУЛЯТАХ САМЦОВ И ВЫЖИВАНИЯ СПЕРМИЕВ

А н н о т а ц и я

Изучали корреляции между активностью, содержанием изоформ аспартатаминотрансферазы и выживанием спермиев в эякулятах самцов. В сперме мужчин, боровов и бугаев активность фермента составляет, соответственно, $70,0 \pm 5,1$; $53,3 \pm 8,8$ и $63,2 \pm 6,3$ нмоль/мин×мг белка. Фермент проявляется двумя изоформами (АСТ1 и АСТ2), которые отличаются между собой электрофоретической подвижностью и интенсивностью окрашивания. Между активностью фермента и длительностью выживания спермиев мужчин существует позитивная сильная ($\eta = 0,742$), спермиев бугаев — средней силы ($\eta = 0,330$), а спермиев борова негативная ($\eta = 0,532$) корреляция. При этом, от содержанию АСТ1-изоформы для выживания спермиев в сперме мужчин и бугаев существует позитивная зависимость средней силы ($\eta = 0,657$ и $0,639$), а борова — сильная ($\eta = 0,769$). Корреляционное отношение между содержанием АСТ2-изоформы и длительностью выживания спермиев негативное сильное в сперме мужчин и боровов ($\eta = 0,740$ и $0,722$), а бугаев — средней силы ($\eta = 0,586$).

1. Северина Е. С. Биохимия / Под ред. Е. С. Северина. — М. : Мир, 2003. — С. 119–124.

2. Córdoba M. Heparin and quercetin generate differential metabolic pathways that involve aminotransferases and LDH-X dehydrogenase in cryopreserved bovine spermatozoa / M. Córdoba, L. N. Pintos, M. T. Beconi // Theriogenology. — 2007. — Vol. 67 — P. 648–654.

3. Косенко М. В. Репродуктивна функція і андрологічна диспансеризація бугаїв / М. В. Косенко, Б. М. Чухрій, І. Я. Коцюмбас та ін. — Львів, 2007. — 186 с.
4. Ibrahim M. A. R. Bulls seminal plasma enzyme activities as indicators of spermatozoa motility, fertility and freezability / M. A. R. Ibrahim // Acta Veter. Acad. Scient. Hung. — 1982. — Vol. 30. — P. 227–233.
5. Nadroo G. A. Studies on transaminases and phosphatases in semen plasma of Jersey and crossbred bulls / G. A. Nadroo, V. B. Saxena, S. S. Tripathi // Indian. Veter. J. — 1987. — Vol. 64. — P. 1053–1056.
6. Kakar S. S. Acrosomal damage and enzyme leakage during freeze preservation of buffalo spermatozoa / S. S. Kakar, S. R. Anand // Indian. J. exper. biol. — 1984. — Vol. 22. — P. 5–10.
7. Slaweta R. Biologiczne wlasciwosci nasienia buhaja w zaleznosci od endogennego i egzogenego glutationu / R. Slaweta // Problemy rozrodu w swetle wspolecznych badan. — Warszawa, 1987. — Cz. 2. — P. 61–72.
8. Slaweta R. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull sperm / R. Slaweta, T. Laskowska // Anim. Reprod. Sci. — 1987. — Vol. 13. — P. 249–253.
9. Лабораторные методы исследования в клинике / под. ред. В. В. Меньшикова. — М. : Медицина. — 1987. — С. 189–190.
10. Alfano J. Isolation and characterization of a gene coding for a novel aspartate aminotransferase from rhizobium meliloti / J. Alfano, M. Kahn // Journal of Bacteriology — 1993. — Vol. 175. — P. 4186–4196.
11. Плохинский Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. — М. : МГУ, 1970. — С. 53–60.

Рецензент: завідувач лабораторії фізіології та патології відтворення тварин, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Шаран М. М.