

ІЗОФОРМИ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ У СПЕРМІ ТА РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНАХ БУГАЇВ

Н. В. Насєдкіна, Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів

Інститут біології тварин НААН

Вивчали ізоформи холінестерази у спермі та репродуктивних органах бугаїв. Встановлено, що для еякуляторів, тканин сім'яника і придатка характерні три ізоформи холінестерази, які за швидкістю руху в 10 % ПААГ позначили (від найменш до максимально рухливої) ХЕ1, ХЕ2 і ХЕ3. Ізоформи ферменту в спермі та репродуктивних органах відрізняються інтенсивністю зафарбовування і відсотковим вмістом у загальному спектрі білків ферменту. Еякуляти бугаїв характеризуються високим вмістом ХЕ2-ізоформи ферменту (41,4–66,7 %), яка розміщена в зоні α -глобулінів сперми. Для сім'яника і придатка характерний високий вміст ХЕ3-ізоформи ферменту (65,4–79,8 %). Вміст ізоформ ферменту в еякулятах і тканинах репродуктивних органів залежить від індивідуальних особливостей плідників.

Ключові слова: ХОЛІНЕСТЕРАЗА, ІЗОФОРМИ, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, РЕПРОДУКТИВНІ ОРГАНИ, СПЕРМА, БУГАЇ

Холінестерази (ХЕ) — клас ферментів, що гідролітично розщеплюють складні ефіри холіну до холіну і карбонових кислот. Розрізняють два типи холінестераз: ацетилхолінестеразу (КФ 3.1.1.7, ацетилхолін-ацетилгідролаза; АХЕ — специфічна) і бутирилхолінестеразу (КФ 3.1.1.8, ацетилхолін-ацилгідролаза; БХЕ — неспецифічна). АХЕ і БХЕ відрізняються як за фізико-хімічними властивостями, так і субстратною специфічністю. Для АХЕ специфічним субстратом є ацетилхолін, а БХЕ гідролізує бутирилхолін, ацетилхолін, бензоїлхолін, сукцинілхолін та інші ефіри холіну. Відрізняються вказані ферменти й місцем локалізації в організмі: специфічна холінестераза виявляється в еритроцитах, нервовій і м'язовій тканинах, а неспецифічна — у сироватці крові, печінці, підшлунковій залозі. Крім цього, виявлено, що ферменти в електричному полі розділяються на ізоформи, кількість яких залежить від фізіологічного стану організму [1–3], індивідуальних особливостей [4], а також функцій тканин і клітин [5–7].

Мета досліджень — вивчити вміст ізоформ холінестерази в репродуктивних органах і спермі бугаїв.

Матеріали і методи

Дослідження проведені у НВЦ "Західплемресурси" на 10 плідниках української чорно- та червоно-рябої молочної, голштинської та симентальської порід і ТзОВ "Пустомитим'ясо" на 5 бугаях чорно-рябої молочної породи віком 12-15 міс.

Для досліджень використовували еякуляти, які отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень, та тканини репродуктивних органів (сім'яник та придаток сім'яника), які відбирали після забою бугаїв. Тканини гомогенізували в гомогенізаторі Поттера при температурі 4°C в 0,25М сахарозі при 6000 об/хв протягом 2 хв. Гомогенат центрифугували 15 хв при 8000 об/хв і відбирали супернатант для дослідження білків ферменту.

Для виявлення ізоформ ХЕ проводили електрофорез у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Проби для електрофорезу готували наступним чином: сперму та супернатант розводили, відповідно, 1:4 та 1:2 5 мМ Тріс-гліциновим буфером (рН 8,5) і додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (концентрація білка ~

150 мкг). Після електрофорезу виявляли ізоформи ХЕ [8]: пластини ПААГ відмивали від електродного буферу 30 хв у 8 мМ Тріс-НСІ буфері (рН 7,4) та інкубували 30 хв при температурі 37 °С у середовищі, що містило 20 мкг α -нафтилацетату і 50 мкг діазолію синього С у 100 мл 8 мМ Тріс-НСІ буфера. Внаслідок розщеплення ферментом α -нафтилацетату та специфічної реакції α -нафтолу з діазолієм синім С у зонах локалізації білків ХЕ утворюється нерозчинний комплекс червоно-коричневого кольору. Копії фореграм отримували прямим скануванням ПААГ. Відносний вміст ізоформ (%) вираховували з використанням програмного забезпечення Soft Spectr 1.3. Аналіз результатів досліджень проведено за Н. А. Плохінським [9].

Результати й обговорення

У цільній спермі бугаїв існує три ізоформ ХЕ, які за швидкістю руху в 10 % ПААГ позначили (від найменш до максимально рухливої) ХЕ1, ХЕ2 і ХЕ3 (рис. 1 А; Б). У спектрі розчинних білків сперми фермент локалізований у зонах рухливості: ХЕ1 і ХЕ2-ізоформи α -глобулінів і ХЕ3 – альбуміна сироватки крові (рис. 1. В).

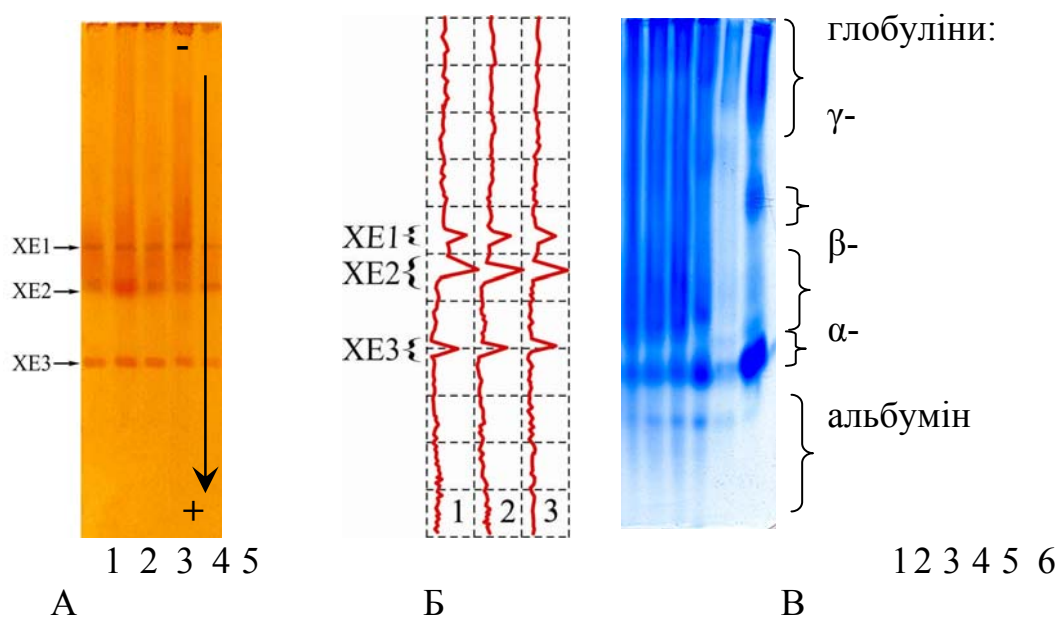


Рис 1. Ізоферменти холінестерази і спектр білків сперми бугаїв: А - копії фореграм ізоферментів ХЕ: 1–5 — білки ферменту різних еякулятів; Б — денситограма білків холінестерази: ХЕ1–ХЕ3 — ізоформи ферменту; В — копії фореграм білків: 1–5 — сперми; 6 — сироватки крові

Візуальне оцінювання фореграм свідчить, що еякуляти бугаїв характеризуються індивідуальними особливостями вмісту ізоформ ХЕ, які проявляються неоднаковою інтенсивністю їх зафарбовування. Різна інтенсивність зафарбовування ізоферментів ХЕ визначає їх вміст у загальному спектрі активних білків ферменту. Так, у спермі виявлено найбільший вміст ХЕ2-ізоформи ($52,7 \pm 5,4$ %) і менший вміст ХЕ1 та ХЕ3 (відповідно, $23,8 \pm 4,8$ і $23,5 \pm 5,1$ %; табл. 1).

Таблиця 1

Вміст ізоформ холінестерази в еякулятах бугаїв ($M \pm m$; $n=29$)

Ізоформи	Вміст ізоформ, %	lim
ХЕ1	$23,8 \pm 4,8$	13,5–32,2
ХЕ2	$52,7 \pm 5,4$	41,4–66,7
ХЕ3	$23,5 \pm 5,1$	11,8–32,9

Встановлені відмінності вмісту ізоформ ферменту в спермі бугаїв свідчать про неоднозначну їх участь у забезпеченні метаболічної активності статевих клітин і, відповідно, про різну якість як еякулятів, так і сперміїв.

У гомогенатах тканин сім'яника та його придатка також виявлено три ізоформи ХЕ (рис. 2). При цьому, на відміну від сперми, ізоформи ХЕ1 і ХЕ2 тканин репродуктивних органів бугаїв характеризуються нижчою електрофоретичною рухливістю.

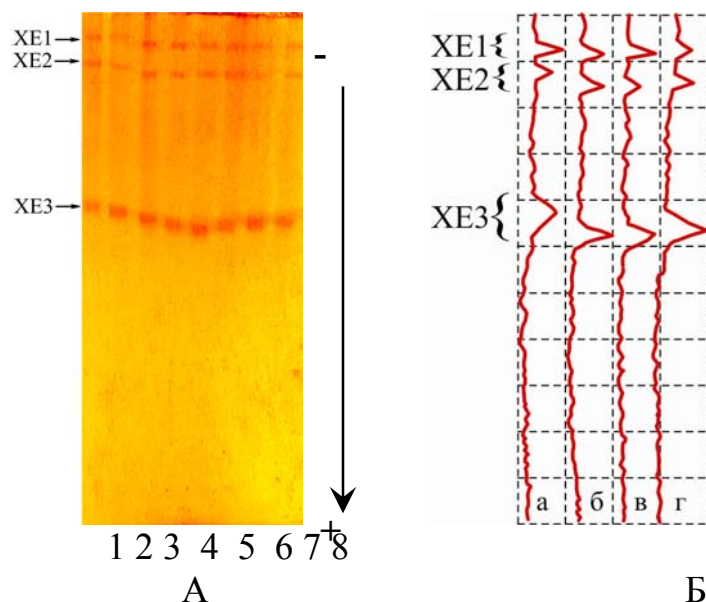


Рис 2. Ізоферменти холінестерази тканин репродуктивних органів бугаїв; А — копії фореграм ХЕ: 1, 2 — сім'яника; придатка: 3, 4 — голівки; 5, 6 — тіла; 7, 8 — хвоста; Б — денситограма білків холінестерази; а — сім'яник; придаток сім'яника: б — голівка; в — тіло; г — хвіст; ХЕ1–ХЕ3 — ізоформи ферменту

Крім цього, залежно від тканин, білки ферменту відрізняються інтенсивністю та площею зафарбовування. Встановлено, що в тканинах сім'яника і його придатка найбільше міститься (65,4–79,8 %) ХЕ3-ізоформи, менше (9,3–21,2 %) ХЕ1 і найменше (9,6–15,3 %) ХЕ2 (табл. 2). При цьому, виявлено різниці вмісту ізоформ у репродуктивних органах.

Таблиця 2

Вміст ізоформ холінестерази в тканинах репродуктивних органів бугаїв ($M \pm m$; $n=5$)

Ізоформи	Вміст ізоформ у тканині, %			
	сім'яника	придатка сім'яника		
		голівка	тіло	хвіст
ХЕ1	21,2 $\pm$ 0,34	14,5 $\pm$ 0,27**	21,0 $\pm$ 1,06	9,3 $\pm$ 0,94**
ХЕ 2	13,4 $\pm$ 0,77	15,3 $\pm$ 2,89	9,6 $\pm$ 0,63**	10,9 $\pm$ 0,80*
ХЕ 3	65,4 $\pm$ 0,41	70,2 $\pm$ 3,16	69,4 $\pm$ 2,70	79,8 $\pm$ 1,74**

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно з тканиною сім'яника * — $p<0,05$; ** — $p<0,001$

Так, у сім'янику вміст ХЕ3-ізоформи найнижчий і становить 65,4 $\pm$ 0,41 %. Найбільший її вміст (79,8 $\pm$ 1,74 %) виявлено у хвості придатка, а у голівці та тілі він більший, відповідно, на 4,0 і 4,8 % порівняно з сім'яником. Очевидно, виявлені різниці вмісту ХЕ3-ізоформи зумовлені фізіологічними процесами: сперміогенезом у сім'янику та дозріванням статевих клітин у придатку, а після еякуляції, здатністю до поступального руху і запліднення ооцита.

На відміну від ХЕ3-ізоформи, вміст ХЕ2-ізоформи у тканинах сім'яника та голівки придатка майже однаковий (відповідно, 13,4 і 15,3 %) і менший на 2,5 і 5,7 % у тілі та хвості придатка сім'яника порівняно з сім'яником. Різниця між вмістом вказаної ізоформи в тканинах сім'яника та тіла і хвоста придатка статистично вірогідна (відповідно, $p<0,001$ та $p<0,05$).

Вміст ХЕ1-ізоформи у тканинах репродуктивних органів також відрізняється. Так, у сім'янику та тілі придатка він однаковий (21,0 %), менший на 6,7 % ($p<0,001$) у голівці та

найменший ($9,3 \pm 0,94$ %; $p < 0,001$) у хвості придатка. Таким чином, тканини репродуктивних органів відрізняються між собою за вмістом ізоформ ферменту, що свідчить про існування тканинної специфічності білків ХЕ, зумовленої фізіологічними особливостями досліджених тканин, процесами утворення і дозрівання спермій у репродуктивних органах бугая.

Висновки

1. У цільній спермі та тканинах сім'яника і придатка сім'яника бугаїв виявлено три ізоформ ХЕ, які відрізняються між собою за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю зафарбовування.

2. Еякуляти бугаїв характеризуються високим вмістом ХЕ2-ізоформи ферменту (41,4–66,7 %), яка розміщена в зоні α -глобулінів сперми.

3. Для репродуктивних органів характерний високий вміст ХЕ3-ізоформи ферменту (65,4–79,8 %).

4. Вміст ізоформ ферменту в еякулятах і тканинах репродуктивних органів залежить від індивідуальних особливостей плідників і проявляється різною інтенсивністю зафарбовування смуг та відсотковим вмістом білків ферменту в їх загальному вмісті.

Перспективи подальших досліджень. Вивчити залежність фізіологічних показників спермій від вмісту ізоформ холінестерази в еякулятах бугаїв.

N. V. Nasedkina, N. V. Kuzmina, D. D. Ostapiv

THE ISOFORMS OF CHOLINESTERASE IN BULL SPERM AND REPRODUCTIVE ORGANS

S u m m a r y

Isoforms of cholinesterase in bull sperm and reproductive organs were studied. It was found that for ejaculates, tissue of testis and epididymis characterizes by three isoforms of cholinesterase, that were marked, by movement speed in 10% PAAG, XE1, XE2 та XE3 (from less to more mobile). Isoforms of enzyme in semen and reproductive organs differ by color intensity and percentage of the total spectrum of enzyme proteins. Bull ejaculates characterizes by high content of XE2-isoform (41,4–66,7 %), that is located in the area of α -globulin in sperm. Testis and epididymis characterizes high content of XE3-isoform of enzyme (65,4–79,8 %). The content of enzyme isoforms in ejaculates and tissues of reproductive organs depends on individual characteristics of breeders.

H. B. Наседкина, H. B. Кузьмина, Д. Д. Остапів

ИЗОФОРМЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В СПЕРМЕ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНАХ БЫКОВ

А н н о т а ц и я

Изучали изоформы холинэстеразы в сперме и репродуктивных органах быков. Установлено, что для эякулятов, тканей семенника и придатка характерны три изоформы холинэстеразы, которые по скорости движения в 10% ПААГ обозначили (от наименее до максимально подвижной) ХЕ1, ХЕ2 и ХЕ3. Изоформы фермента в сперме и репродуктивных органах отличаются интенсивностью окраски и процентным содержанием в общем спектре белков фермента. Эякуляты быков характеризуются высоким содержанием ХЕ2-изоформы фермента (41,4–66,7%), которая находится в зоне α -глобулинов спермы. Для семенника и придатка характерно высокое содержание ХЕ3-изоформы фермента (65,4–79,8%). Содержание

изоформ фермента в эякулятах и тканях репродуктивных органов зависит от индивидуальных особенностей производителей.

1. Juul P. Human plasma cholinesterase isoenzymes / P. Juul // Clin. Chim. Acta. — 1968. — V. 19. — P. 205–213.
2. Analysis of cholinesterases in human prostate and sperm: implications in cancer and fertility / S. Nieto-Cerón, H. Vargas-López, M. Pérez-Albacete et al. // Chem. Biol. Interact. — 2010. — V. 187, № 1–3. — P. 432–435.
3. Karczma A. G. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases. — A review / A. G. Karczma // Chem. Biol. Interactions. — 2010. — V. 187, № 1–3. — P. 34–43.
4. Nawrot P. S. Biochemical and Electrophoretic Studies of Cholinesterases in the Muscular Dysgenesis (rndg) Mutant Mouse / P. S. Nawrot, W. E. Howell, B. S. Wenger // Teratology. — 1979. — V. 20. — P. 7–16.
5. Egbunike G. N. Effect of chloroquine on the motility and acetylcholinesterase activity of porcine spermatozoa during epididymal maturation / G. N. Egbunike // Andrologia. — 1982. — V. 14, № 6. — P. 503–508.
6. Modified testicular expression of stress-associated ‘readthrough’ acetylcholinesterase predicts male infertility / I. Mor, D. Grisaru, L. Titelbaum et al. // The FASEB Journal. — 2001. — V. 15. — P. 2039–2041.
7. The effect of the readthrough acetylcholinesterase variant (AChE-R) on uterine muscle and leiomyomas / D. Grisaru, R. Keidar, L. Schreiber et al. // Mol. Hum. Reprod. — 2007. — V. 13, № 5. — P. 351–354.
8. Maynard E. A. Electrophoretic studies of cholinesterases in brain and muscle of the developing chicken / E. A. Maynard // J. Exp. Zool. — 1966. — V. 161. — P. 319–336.
9. Плохинский Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. — Москва: МГУ, 1970. — 358 с.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.