

APPLICAZIONE DI UN KIT DI ANALISI PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA SUPEROSSIDO DISMUTASI NEL SEME CRIOCONSERVATO DI ASINO

QUANTITATIVE DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN CRIOCONSERVED DONKEY SEMEN BY USING A COMMERCIAL KIT

MICHELE DUCCI ⁽¹⁾, SARA PACCHINI ⁽²⁾, ANTONIO FELICOLI ⁽¹⁾,
COSIMO DUCCI ⁽⁴⁾, CLAUDIO SIGHIERI ⁽¹⁾, ALESSANDRA ROTA ⁽³⁾,
FRANCO MARTELLI ⁽¹⁾, ANGELO GAZZANO ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Le superossido dismutasi (SOD) sono una classe di metalloenzimi che catalizzano la dismutazione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno, attraverso reazioni di ossido-riduzione che coinvolgono lo ione metallo del sito attivo. Sotto questo aspetto, la SOD assume un ruolo centrale nella risposta dell'organismo alla tossicità dei sottoprodotti metabolici dell'ossigeno. Alla luce del coinvolgimento delle diverse forme di SOD nei meccanismi legati allo stress ossidativo, quali l'invecchiamento e l'insorgenza di varie patologie, sono stati sviluppati alcuni kit per il dosaggio quantitativo delle SOD nel sangue. Nell'ambito di un rinnovato interesse degli aspetti riproduttivi per specie minori di interesse zootecnico, la determinazione quantitativa della SOD nell'eiaculato può essere di particolare utilità per lo sviluppo e messa a punto di tecniche di conservazione e di valutazione della qualità del seme.

Scopo di questa indagine è stato quello di verificare la possibilità di applicare un kit commerciale per la determinazione della SOD negli spermatozoi e nel plasma seminale di Asino amiatino, specie questa di particolare interesse per la salvaguardia di una razza autoctona in via di estinzione. I dati ottenuti hanno mostrato la presenza di questo enzima nelle due tipologie di campione e che, a parità di % di inibizione, nel plasma seminale la SOD è risultata 10 volte più concentrata (235,65 UI/ml) rispetto a quella determinata negli spermatozoi (19,15 UI/ml). Di particolare interesse applicativo è risultata la determinazione della diluizione ottimale che ha consentito di rilevare la % di inibizione che rimane su valori costanti per le diluizioni di 1/110 - 1/140 per gli spermatozoi (concentrazione del campione 575×10^6 spermatozoi/ml) e di 1/1400 - 1/1700 per il plasma seminale che corrispondono al tratto lineare della cinetica enzimatica della SOD.

La diversa concentrazione di SOD nei due campioni, a parità di % di inibizione, potrebbe essere una caratteristica intrinseca come pure, invece, essere dovuta alla procedura di preparazione del campione. Infatti l'utilizzo della procedura del *cold-shock* potrebbe avere permesso la liberazione di enzimi dal cappuccio acrosomiale che, a loro volta, potrebbero avere contribuito ad inattivare parte della SOD presente oppure, di converso, l'efficienza della rottura delle membrane negli spermatozoi potrebbe non essere stata sufficiente.

⁽¹⁾ Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Direttore Prof. Franco Martelli.

⁽²⁾ Dottorando in Medicina veterinaria, Anno 2006.

⁽³⁾ Dipartimento di Clinica Veterinaria, Direttore Prof. Francesco Camillo.

⁽⁴⁾ Collaboratore esterno.

Lavoro eseguito con finanziamento PRIN, numero protocollo 2004075420_003.

In conclusione: il kit pur essendo specifico per campioni eritrocitari può risultare applicabile anche a campioni biologici diversi quali gli spermatozoi ed il plasma seminale di asino purché l'analisi della SOD venga effettuata nell'intervallo di diluizione 1/110 – 1/140 per gli spermatozoi (concentrazione del campione $575 \cdot 10^6$ spermatozoi/ml) e di 1/1400 – 1/1700 per il plasma seminale.

Parole chiave: SOD, spermatozoi, plasma seminale, asino.

SUMMARY

Superoxide dismutase (SODs) are metalloenzymes that catalyze the dismutation of the superoxide anion to oxygen peroxide and molecular oxygen by redox cycling involving a metal ion. Superoxide dismutase is an important enzyme in the antioxidant cellular pathway so the amount of SOD in cell and in the extracellular environment have consequences in prevention of aging and disease. The oxide anion dismutation catalyzed by the SOD in a very fast reaction ($2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ turnover) and one unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. In order to assay the SOD activity in plasma, serum, erythrocyte and cell lysate several kit are available.

The aim of this investigation was to assay SOD activity in seminal plasma and spermatozoa of the Amiata Donkey by using a commercial kit. The Amiata Donkey is an endangered native species and SOD quantitation could contribute for the development and new set up of semen conservation methods and quality valuation.

SOD was detected into both the samples.

SOD in seminal plasma resulted to be 10 time more concentrate (235,65 UI/ml) than in spermatozoa (19,15 UI/ml).

Concentration differences between the two samples could be a real sample intrinsic difference as well could be due to the spermatozoa protein extraction method. Spermatozoa underwent to a cold-shock treatment so that the subsequent release into the medium of the acrosomal proteinase could have, as a consequence, the partial inactivation of the SOD; as well the same treatment could be not sufficient for the complete membrane disruption.

The kit resulted suitable for the assay of the SOD into ejaculate of the Amiata Donkey in the dilution range (1/110–1/140) in spermatozoa (with a concentration of $575 \cdot 10^6$ spermatozoa/ml) and (1/1400 – 1/1700) for the seminal plasma.

Key words: SOD, spermatozoa, seminal plasma, donkey.

INTRODUZIONE

Gli spermatozoi sono cellule estremamente suscettibili allo stress ossidativo causato dai radicali liberi. La Superossido Dismutasi (SOD) è un enzima antiossidante in grado di accelerare la dismutazione del radicale superossido (O_2°), prodotto durante i processi ossidativi, in perossido di idrogeno ed ossigeno molecolare (Rodriguez et

al., 2002). Le Cu/Zn SOD si trovano in tutte le specie eucariotiche sia nei vegetali che negli animali e sono anche largamente distribuite nel periplasma dei procarioti (Pesce et al., 1997). Negli animali sono presenti negli invertebrati, nei pesci, rettili, uccelli e mammiferi. In tutte le specie eucariotiche le Cu/Zn SOD si presentano sottoforma di omodimeri di circa 2x16kDa localizzate nel citosol (SOD₁), nello spazio intermembrana e nei lisosomi. Diverse Cu/Zn SOD sono presenti anche come forme extracellulari (SOD₃) (Bordo et al., 2001). Infine vi è la Mn SOD presente nella matrice mitocondriale (SOD₂) degli eucarioti e nella parte centrale, associata al DNA, nei batteri gram-. In questi ultimi, nella parte periferica nei pressi della membrana interna, si trova la Fe SOD (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001).

Per la determinazione quantitativa della SOD sono disponibili in commercio molti kit di analisi messi a punto per il suo dosaggio eritrocitario; in particolare alcuni di questi si basano su reazioni colorimetriche misurabili mediante analisi spettrofotometrica. Un metodo diffuso utilizza la xantina come substrato e la xantina ossidasi per generare il radicale superossido che, a sua volta, in assenza di SOD reagisce con un cromogeno riducendolo (il cloruro di 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenoltetrazolio (I.N.T.)) per formare un pigmento, il formazan rosso. La SOD, se presente, reagisce a sua volta con il superossido sequestrandolo al cromogeno. Pertanto l'attività della SOD è misurata in base alla mancata reazione del superossido con il cromogeno che viene definita inibizione della reazione colorimetrica. In presenza di SOD, quindi, la reazione colorimetrica viene inibita con una % di inibizione direttamente proporzionale alla sua concentrazione. Un'unità di SOD è quella che inibisce al 50% la velocità di riduzione dell'INT.

Vista la ampia diffusione di questo enzima nelle cellule degli organismi eucarioti appare particolarmente interessante indagare sull'applicabilità di alcuni di questi kit al dosaggio della SOD presente in campioni biologici non eritrocitari di interesse veterinario. Alla luce di un rinnovato interesse per gli aspetti riproduttivi delle razze minori di interesse zootecnico potrebbe risultare utile misurare questo enzima, come altri, coinvolti nella disattivazione delle specie reattive ossigenate (ROS) presenti in campioni biologici quali spermatozoi e plasma seminale. I campioni di seme, infatti, risultano estremamente variabili sia in base alle loro caratteristiche seminali (concentrazione di spermatozoi, motilità, anomalie morfologiche, caratteristiche cinetiche, ecc.) che alle differenze dovute all'insieme plasma spermatozoi nell'ejaculato che può variare da soggetto a soggetto e/o nello stesso soggetto in funzione della stagione e/o delle condizioni fisiologiche, rendendo difficile una valutazione oggettiva della qualità seminale.

Lo scopo della ricerca è stato quello di indagare la possibilità di applicare un kit per il dosaggio della SOD negli eritrociti anche agli spermatozoi e al plasma seminale per una possibile futura valutazione del ruolo esercitato dalle principali sostanze antiossidanti sulla % di fecondazione del seme di Asino amiatino. In particolare l'interesse si è focalizzato sulla ricerca di una diluizione ottimale di questi campioni biologici che risultasse la più adeguata possibile per la determinazione della SOD.

MATERIALI E METODI

Metodica d'analisi e condizioni del sistema

Kit Ransod SD125 (Randox Laboratories Ltd.); Spettrofotometro: Ultrospec 2000 UV/visibile (Pharmacia Biotech, Cambridge-England). L'analisi spettrofotometrica è stata eseguita secondo la metodica descritta nel kit che prevede la lettura della D.O. a 30" e a 3' alla lunghezza d'onda di 505 nm. Questo kit prevede inoltre la diluizione del campione in modo tale da ottenere una inibizione compresa tra il 30 e 60 % (intervallo di linearità della curva).

Allestimento curva standard

La curva di taratura è stata allestita con concentrazioni scalari (5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,208 UI/ml) utilizzando lo standard di SOD presente nel kit ricostituito con diluente Ransod. Il punto S₁ era costituito unicamente da diluente Ransod (Tab. I).

| Tab. I. Diluizioni scalari del campione standard di Superossido dismutasi in dotazione al kit d'analisi. <i>Standard dilutions of the Superoxide dismutase sample belong to the kit.</i> | |
|---|---------------------|
| Standard | SOD (UI/ml) |
| S ₆ | 5 |
| S ₅ | 2,5 |
| S ₄ | 1,25 |
| S ₃ | 0,625 |
| S ₂ | 0,208 |
| S ₁ | 0 (diluente ransod) |

Reagenti utilizzati

Fosfato di Potassio Monobasico Anidro (Sigma-Aldrich S.r.l. - Milano); Fosfato di Sodio Dibasico Anidro (Sigma - Aldrich S.r.l. - Milano); Diluente Ransod (Randox Laboratories Ltd.).

Preparazione dei campioni

I campioni di seme d'asino prelevati mediante vagina artificiale sono stati sottoposti a centrifugazione, 4000 rpm per 5', così da separare il plasma seminale dagli spermatozoi. Il pellet di spermatozoi addizionato con 1 ml di NaCl 0,9%, è stato mescolato mediante capovolgimento della provetta e centrifugato a 4000 rpm per 3". Dopo centrifugazione il sovranatante veniva eliminato; questo procedimento era ripetuto per 3 volte successive al fine di eliminare completamente i residui di plasma seminale. Infine il pellet contenente gli spermatozoi così lavati è stato sospeso in 500 µl

di NaCl 0,9% ed è stata calcolata la concentrazione degli spermatozoi mediante conta con camera di Thoma dopodiché il campione di spermatozoi è stato crioconservato a T° -20°C fino al momento dell'analisi. Il campione congelato è stato sottoposto a tre cicli di scongelamento congelamento *cold-shock* (azoto liquido – acqua a 38°C) al fine di romperne la membrana plasmatica prima dell'analisi. Infine i campioni di spermatozoi sono stati diluiti con una soluzione 0,01 moli/litro di tampone fosfato a pH 7 in modo da ottenere le seguenti diluizioni scalari (Tab. II).

Il plasma seminale anch'esso crioconservato a -20 C° , al momento dell'analisi è stato sottoposto a una serie di diluizioni scalari col medesimo tampone utilizzato per gli spermatozoi (Tab. III).

RISULTATI

La concentrazione del campione di spermatozoi era di $575 \cdot 10^6$ spermatozoi/ml.

Nelle Tab. II e III sono riportati i valori rilevati dall'analisi dei campioni di spermatozoi e di plasma seminale.

Come si può osservare le diluizioni effettuate sul campione di spermatozoi sono dieci volte inferiori rispetto a quelle del plasma seminale. Anche le UI/ml di SOD ottenute alle varie diluizioni risultano di gran lunga superiori nel plasma seminale.

| Tab. II. % di inibizione e UI/ml [$575 \cdot 10^6$ spz] di SOD ottenute alle varie diluizioni effettuate sul campione di spermatozoi di asino. <i>Inhibition % and SOD IU/ml [$575 \cdot 10^6$ spz] of the donkey spermatozoa diluted sample.</i> | | |
|--|------------------------------------|--|
| Diluizione / <i>Dilution</i> | % inibizione / <i>Inhibition %</i> | SOD (UI/ml) [$575 \cdot 10^6$ spz] |
| 20 | 91 | 66,89 |
| 50 | 75 | 69,66 |
| 90 | 59 | 53,27 |
| 100 | 49 | 34,67 |
| 110 | 38 | 21,17 |
| 120 | 33 | 17,67 |
| 130 | 33 | 19,15 |
| 140 | 31 | 18,53 |
| 150 | 20 | 11,02 |
| 160 | 8 | 6,19 |
| 170 | 0 | 4,28 |

Tab. III. % di inibizione e UI/ml di SOD ottenute alle varie diluizioni effettuate sul campione di plasma seminale di asino. *Inhibition % and SOD IU/ml of the donkey seminal plasma diluted sample.*

| Diluizione / Dilution | % inibizione / inhibition % | SOD (UI/ml) |
|-----------------------|-----------------------------|-------------|
| 200 | 93 | 729,90 |
| 400 | 82 | 810,42 |
| 800 | 66 | 688,63 |
| 1000 | 59 | 591,90 |
| 1050 | 56 | 529,34 |
| 1100 | 51 | 424,39 |
| 1150 | 51 | 443,68 |
| 1200 | 51 | 462,97 |
| 1300 | 44 | 344,88 |
| 1400 | 41 | 316,34 |
| 1500 | 33 | 220,92 |
| 1600 | 33 | 235,65 |
| 1700 | 25 | 163,20 |
| 1800 | 16 | 106,77 |
| 1900 | 7 | 69,63 |
| 2000 | 2 | 56,09 |

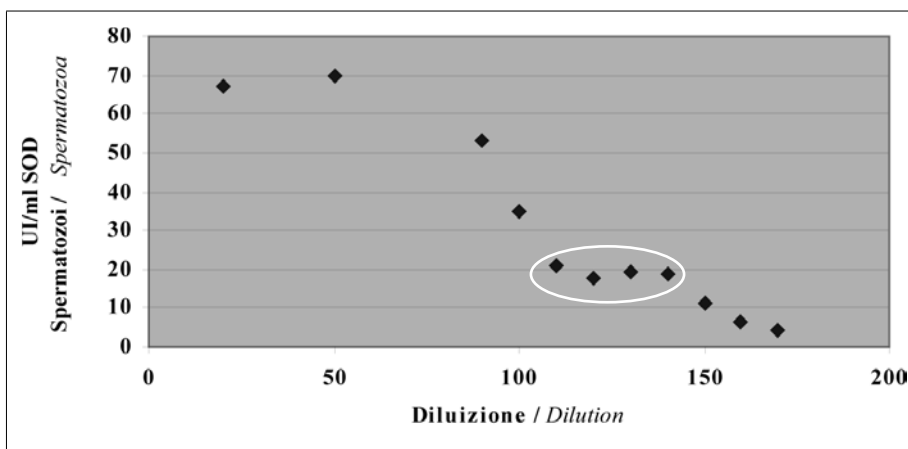


Fig. 1. UI/ml di SOD negli spermatozoi di asino rispetto alle diluizioni effettuate. *SOD IU/ml in donkey spermatozoa versus dilution.*

La Fig. 1 riporta le UI/ml di SOD nel campione di spermatozoi, con concentrazione iniziale di $575 \cdot 10^6$ spz/ml, in funzione della diluizione. Le UI/ml di SOD risultano pressoché costanti (intorno a 20) per l'intervallo di diluizioni del campione compreso tra 1/110 e 1/140.

Nella Fig. 2 si può osservare che nell'intervallo di diluizioni (1/110 - 1/140) la % di inibizione risultava pressoché costante e compresa tra 30 e 40.

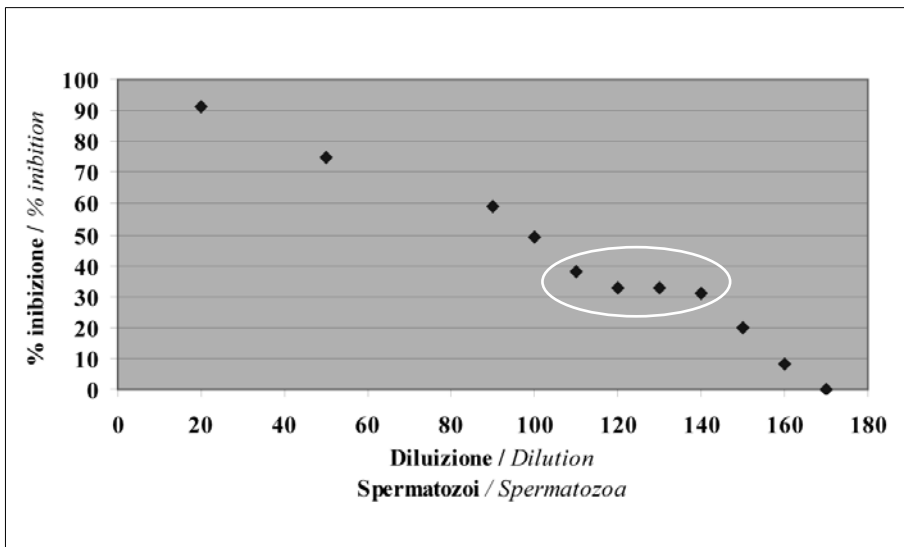


Fig. 2. % inibizione di SOD in campioni di spermatozoi di asino rispetto alle diluizioni effettuate. *Inhibition % of donkey spermatozoa samples versus dilution.*

Nella Fig. 3 si può osservare come per % di inibizione compresa tra 30 e 40 le UI/ml di SOD rimanevano pressoché costanti.

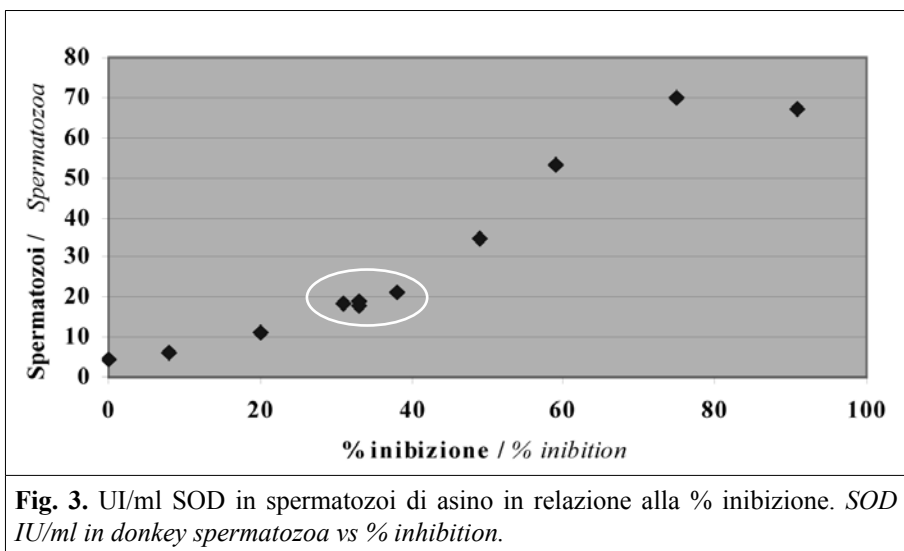


Fig. 3. UI/ml SOD in spermatozoi di asino in relazione alla % inibizione. *SOD IU/ml in donkey spermatozoa vs % inhibition.*

Nella Fig. 4 relativa al campione di plasma seminale sono evidenziabili due plateau in cui le UI/ml di SOD si mantengono costanti al variare della diluizione, il primo per diluizioni comprese tra 1/1100 e 1/1200 e il secondo tra 1/1500 e 1/1700.

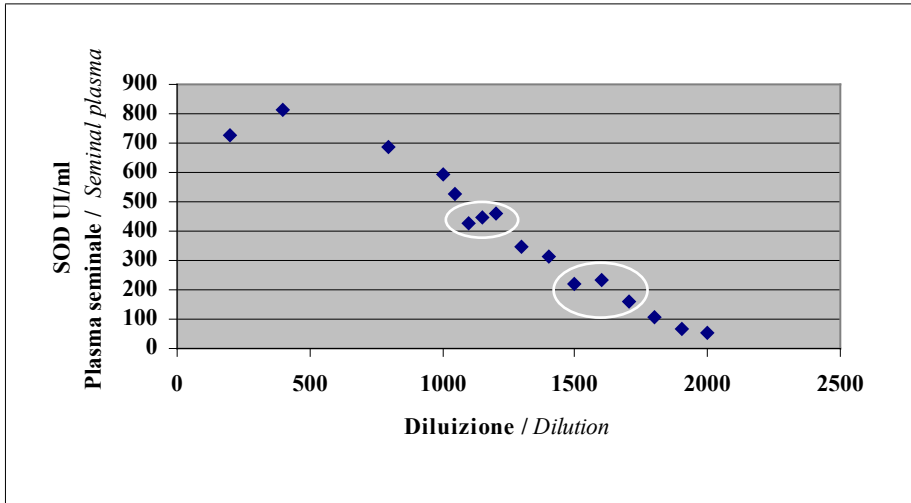


Fig. 4. UI/ml di SOD nel plasma seminale di asino rispetto alle diluizioni effettuate. *SOD IU/ml in donkey seminal plasma versus dilution.*

Nella Fig. 5 si può osservare un primo plateau al 51% di inibizione ed un secondo plateau al 33 % di inibizione.

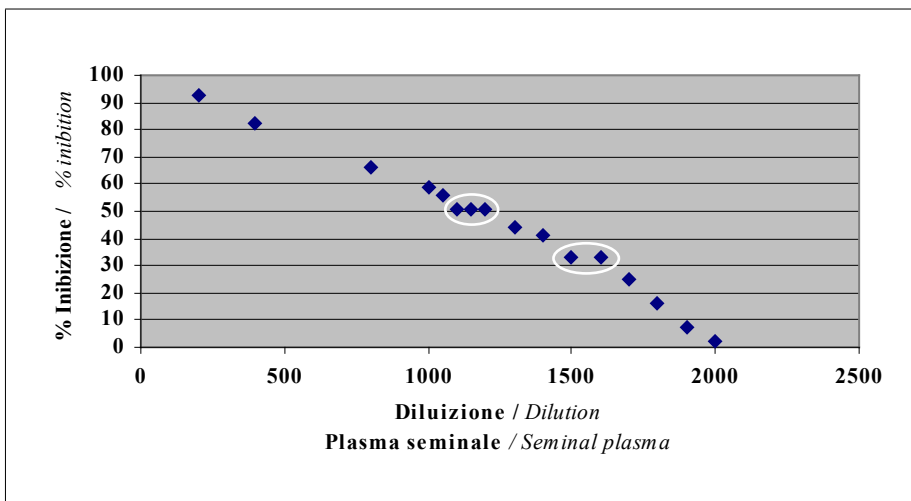
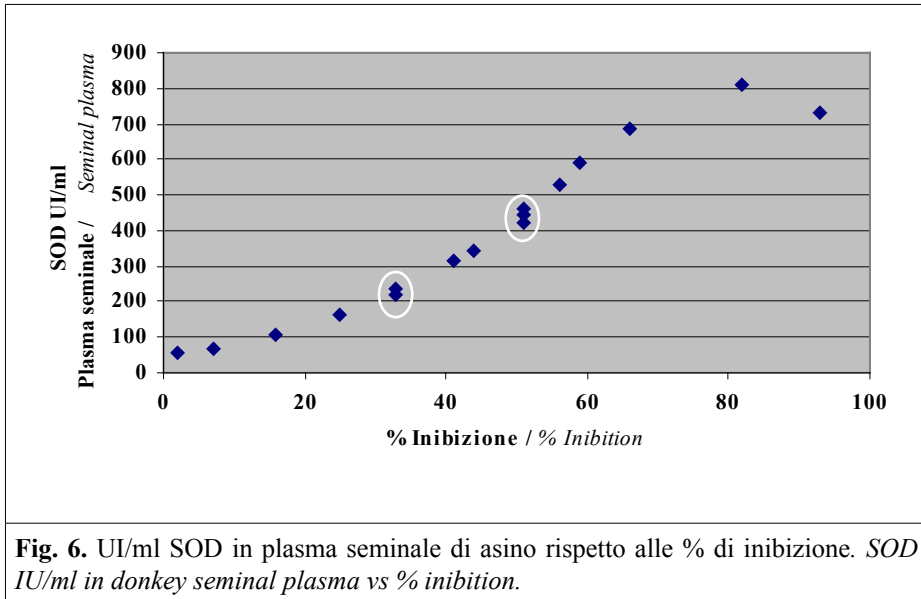


Fig. 5. % inibizione ottenute nel plasma seminale di asino rispetto alle diluizioni effettuate. *% inhibition in donkey seminal plasma vs dilution.*

Nella Fig. 6 si può osservare che per % di inibizione di 50 e di 30 i valori di SOD nel plasma seminale risultavano costanti.



DISCUSSIONE

Da questi primi dati si può rilevare che la SOD con questo kit di analisi è determinabile anche in matrici biologiche diverse da quelle per cui è stato messo a punto.

È stato necessario effettuare una serie di diluizioni sia per il *pellet* di spermatozoi che per il plasma seminale in modo da trovare quelle più idonee per ottenere UI/ml di SOD costanti. Le diluizioni ottimali sono risultate diverse in quanto nel plasma seminale la SOD era 10 volte più concentrata rispetto a quella rilevata negli spermatozoi.

Dalle misure effettuate è risultato che le UI/ml di SOD negli spermatozoi sono un decimo di quelle osservate nel plasma seminale e ciò potrebbe esser dovuto o alla liberazione di enzimi dal cappuccio acrosomiale che potrebbero aver in parte inattivato la SOD, oppure ad una scarsa efficienza della procedura utilizzata per la rottura delle membrane.

L'intervallo di diluizione ottimale per il *pellet* di spermatozoi alla concentrazione di $575 \cdot 10^6$ è risultato quello compreso tra 1/110 e 1/140. In questo intervallo è possibile misurare una % di inibizione compresa tra 30 e 40. Poiché questi due parametri possono subire variazioni in base alla diversa concentrazione degli spermatozoi nel campione, sarebbe utile mantenersi intorno alla concentrazione di $575 \cdot 10^6$ di spermatozoi così da rientrare nell'intervallo delle diluizioni individuate in questa ricerca. Eventuali

variazioni nella diluizione e nella % di inibizione non dipendenti dalla concentrazione degli spermatozoi potrebbero essere dovute alla diversa qualità del seme in termini di motilità e di morfologia.

A questo proposito particolarmente interessante potrebbe essere il prosieguo di questa indagine volta a delineare gli intervalli di diluizione ottimali a partire da concentrazioni di spermatozoi diverse da quelle utilizzate in questo studio. Per il plasma seminale sono stati, invece, osservati due intervalli di diluizione (1/1100 - 1/1200 e 1/1400 - 1/1700) all'interno dei quali le UI/ml di SOD sono rimaste pressoché costanti, ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di più tipi di SOD; in questa matrice infatti la Cu/Zn SOD e Mn SOD hanno turnover diversi (Gray e Carmichael 1992). Per questo campione di plasma seminale l'intervallo di diluizione da utilizzare è quello tra 1/1400 e 1/1700 che dà una % di inibizione compresa tra 30 e 40 come per gli spermatozoi. Anche in questo caso il prosieguo dell'indagine potrebbe esser volto ad analizzare eventuali variazioni da campione a campione dovute ad un diverso apporto alla formazione dell'ejaculato da parte delle ghiandole accessorie.

Ulteriori studi saranno necessari per meglio delineare il ruolo delle diverse procedure di estrazione proteica, del pH e della temperatura e per comprendere meglio la presenza dei due plateau ottenuti dalla analisi dei campioni di plasma seminali al fine di rilevare l'eventuale presenza di più tipi di SOD.

BIBLIOGRAFIA

- BORDO D., PESCE A., BOLOGNESI M. (2001). Cu, Zn superoxide dismutase in prokaryotes and eucaryotes: Handbook of Metalloproteins (ed. Messerschmidt A., Huber R., Poulos T. and Wieghardt K.) :1284-1300, Wiley, England.
- GRAY B., ARMICHAEL A.J. (1992). Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *Biochem. J.*, 281: 795-802.
- OKADO-MATSUMOTO A., FRIDOVICH I. (2001). Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. – *J. Biol. Chem.*, 276: 38338-38393.
- PESCE A., CAPASSO C., BATTISTONI A., FOLCARELLI S., ROTILIO G., DESIDERI A., BOLOGNESI M. (1997). Unique structural features of the monomeric Cu,Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli*, revealed by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.*, 274: 408-420.
- RODRIGUEZ J.A., VALENTINE J.S., EGGERS D.K., ROE J.A., TIWARI A., BROWN R.H., HAYWARD L.J. (2002). Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated Mutations Decrease the Thermal Stability of Distinctly Metallated Species of Human Copper/Zinc Superoxide Dismutase. *J. Biol.Chem.*, 277: 15932-15937.