

АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОЗИМІВ АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗИ У ЗВ'ЯЗКУ З ВИЖИВАННЯМ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

*Н. В. Кузьміна¹, канд. біол. наук,
Д. Д. Остапів¹, д-р с.-г. наук,
О. І. Чайковська², канд. біол. наук,
Р. Д. Остапів², канд. біол. наук,
О. П. Панич², канд. вет. наук*

¹Інституту біології тварин НААН, м. Львів, Україна
вул. Стуса, 38, м. Львів 79034, Україна
oddost@ukr.net

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
alexandra.dndki@gmail.com

Вивчали активність і вміст ізоформ аспартатамінотрансферази (АСТ) в еякулятах бугаїв у зв'язку з виживанням сперміїв.

Для досліджень відбирали еякуляти бугаїв української чорно-рябої молочної породи ($n = 22$). У спермі свіжоотриманій та інкубованій за температури 2-4°C (на першу, другу, третю та четверту доби) вивчали активність та ізоформи АСТ і виживання сперміїв до припинення прямолінійного поступального руху.

Активність АСТ в залежності від тривалості виживання сперміїв становить за більше 100 год. – $65,2 \pm 1,7$ нмоль/хв \times мг протеїну, а до 100 год. нижча на 26,8 % ($P < 0,001$). У спермі плідників виявлено два ізоформи ензиму (АСТ1 та АСТ2), які відрізняються між собою електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю зафарбування у 7,5 % поліакриламідному гелі.

Встановлена кореляція з часом виживання сперміїв – сильна пряма для АСТ1 ($\eta^2_{АСТ1} = 0,88$) та обернена - для АСТ2 ($\eta^2_{АСТ2} = 0,87$) ізоформ. За інкубування сперми співвідношення ізоформ АСТ змінюється – зростає вміст АСТ1 і знижується – АСТ2. Кореляційне відношення за виживанням сперміїв для активності та ізоформ ензиму становить, відповідно, до 100 год. – $\eta^2_{АСТ} = 0,83$; $\eta^2_{АСТ1} = 0,68$ і $\eta^2_{АСТ2} = 0,69$ і більше 100 год. – $\eta^2_{АСТ} = 0,75$; $\eta^2_{АСТ1} = 0,92$ і $\eta^2_{АСТ2} = 0,69$.

Отже, еякуляти бугаїв з пониженим виживанням сперміїв характеризуються вірогідно нижчою активністю АСТ і, відповідно, швидкістю процесу переамінування амінокислот. Зростання постачання субстратів з цитозолу в мітохондрії статевих клітин забезпечує високе виживання сперміїв. Зміни активності та вмісту ізоформ АСТ, які характеризують забезпечення енергією статевих клітин, можуть служити критерієм фізіологічної якості сперміїв свіжоотриманої сперми.

Ключові слова: АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗА, ІЗОЗИМИ, ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ, СПЕРМА, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ.

ACTIVITY AND CONTENT OF ISOZYMES OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE IN CONNECTION WITH THE SURVIVAL OF BULL SPERMATOZOA

N. V. Kuzmina¹, D. D. Ostapiv¹, O. I. Chajkovska², R. D. Ostapiv², O. P. Panych²

¹ Institute of Animal Biology of NAAS
Stusa street, 38, Lviv, 79043, Ukraine
oddost@ukr.net

² State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
Donetska street, 11, Lviv, 79019, Ukraine
alexandra.dndki@gmail.com

The activity and content of aspartate aminotransferase (AST) isoforms in bovine ejaculates due to sperm survival were studied.

Ejaculates of bulls of the Ukrainian black-spotted dairy breed (n = 22) were selected for research. In freshly obtained and incubated semen the activity and isozymes of AST was studied in connection with spermatozoa survival at a temperature of 2-4 °C (on the first, second, third and fourth days) until the cessation of rectilinear translational movement.

AST activity depended on the duration of sperm survival. When survival was more than 100 hours - AST activity was the highest - 65.2 ± 1.7 nmol / min \times mg of protein. When survival was lower - up to 100 hours, enzymatic activity lower by 26.8% (P < 0.001). Two enzymes of the enzyme (AST1 and AST2) were found in the semen of the fetuses, which differ in electrophoretic mobility and intensity of staining in 7.5% polyacrylamide gel.

The established correlation with sperm survival time has a strong straight line for AST1 ($\eta^2_{AST1} = 0.88$) and inverse - for AST2 ($\eta^2_{AST2} = 0.87$) isozymes. During sperm incubation, the ratio of AST isozymes changes - the content of AST1 increases and decreases - AST2. The correlation ratio for sperm survival for enzyme activity and isozymes is up to 100 hours, respectively. - $\eta^2_{AST} = 0.83$; $\eta^2_{AST1} = 0.68$ and $\eta^2_{AST2} = 0.69$ and more than 100 hours - $\eta^2_{AST} = 0.75$; $\eta^2_{AST1} = 0.92$ and $\eta^2_{AST2} = 0.69$.

Therefore, ejaculates of bulls with reduced sperm survival are characterized by lower AST activity and, accordingly, the speed of the amino acid transamination process. Increased supply of substrates from the cytosol in the mitochondria of germ cells ensures high survival of sperm. Changes in the activity and content of AST isozymes, which characterize the energy supply of germ cells, can serve as a criterion for the physiological quality of sperm of freshly obtained sperm.

Keywords: ASPARTATE AMINOTRANSFERASE, ISOZYMES, SPERMATOZOA SURVIVAL, SPERM, ELECTROPHORESIS.

Аспартатамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.1 L-аспартат : 2-оксоглутарат амінотрансфераза, АСТ; глутамат: оксалоацетат трансаміназа, ГОТ), ензим класу трансфераз, що каталізує за участю коензиму піридоксаль-5'-фосфату, обернене перенесення аміногрупи (трансамінування) від L-аспартату на α -кетоглутарат з утворенням оксалоацетату і L-глутамату. АСТ міститься в більшості тканин ссавців, є внутрішньоклітинним ензимом, складається з двох субодиниць і існує у вигляді двох ізоформ – цитозольного (цАСТ, М.м. ~ 92,6 тис.) і мітохондріального (мАСТ, М.м. ~ 89,8 тис.), які відрізняються між собою за фізико-хімічними властивостями. Майже 1/3 загальної внутрішньоклітинної активності АСТ локалізується в цитоплазмі клітин, 2/3 – в мітохондріях (Leung, & Henderson, 1981; Severin, 2003). АСТ виконує роль зв'язуючої ланки між протеїновим і енергетичним обмінами. Продукт її реакції глутамат – вихідна сполука катаболізму амінокислот, а оксалоацетат – один з головних регуляторних чинників, що визначає швидкість функціонування циклу трикарбонових кислот (Córdoba et al., 2007). Ізоформи АСТ є компонентами малат-

аспаратного шунту функціонуючого в більшості клітин організму в тому числі і в сперміях (Mitchell et al., 2009).

Визначення активності АСТ в сироватці або плазмі крові широко використовується в клінічній практиці для діагностики багатьох захворювань, оскільки при порушенні цілісності цитоплазматичної мембрани внаслідок патологічних процесів ензим виділяється з пошкоджених клітин в кров, де його активність, відповідно, значно зростає. Для ензимодіагностики має також велике значення знання про субклітинну локалізацію ензиму. Так, поява в позаклітинній рідині цАСТ, свідчить про наявність запального процесу, а при виявленні мітохондріального ізозиму – про значні пошкодження тканин, зокрема, некроз.

Активність аспаратамінотрансферази проявляється у спермі плідників. Встановлено, що величина активності ензиму в еякулятах, поряд з іншими показниками, може служити маркером запліднювальної здатності сперміїв (Nizański et al., 2001; Kozdrowski, & Dubiel, 2004; Gündoğan et al., 2004; Gaczarzewicz et al., 2010). Тому метою роботи було вивчити активність та вміст ізозимів АСТ в еякулятах бугаїв у зв'язку з виживанням сперміїв.

Матеріали і методи. Для досліджень були використані свіжоотримані еякуляти бугаїв (n = 22), які належать НВО «Західплемресурси». У спермі свіжоотриманій та інкубованій за температури 2-4 °С (на першу, другу, третю та четверту доби) вивчали активність (нмоль/хв×мг протеїну) (Reitmann, & Frankel, 1957), ізоформи протеїнів АСТ (%) і виживання сперміїв (год) до припинення прямолінійного поступального руху.

Виявлення ізозимів АСТ проводили електрофорезом у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ): цільну сперму розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5) і додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,04 мл проби (кінцева концентрація протеїну 100 мкг). Після електрофорезу фарбували ПААГ (Alfano, & Kahn, 1993): інкубували 30 хв за температури 37 °С у середовищі: 0,5 мг/мл піридоксаль-5-фосфату, 30 мг/мл альбуміну, 0,2 М L,D-аспартату, 0,1 М α-кетоглутарату та 150 мг діазолію синього С у 50 мл 0,2 М Na/K фосфатного буферу (рН 7,5). Зони АСТ зафарбовуються в червоно-коричневий колір. Після фарбування гелі фіксували 20 хв в 7 % розчині трихлороцтової кислоти, а залишки незв'язаної фарби відмивали в 7 % розчині оцтової кислоти. За такої обробки забарвлення ізоформ ензиму не змінюється протягом тривалого часу.

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента та η – кореляційного відношення і з застосуванням персонального комп'ютера й програмного забезпечення TotalLab TL120.

Результати й обговорення. За оцінювання змін активності АСТ. в залежності від тривалості виживання сперміїв, встановлено, що за виживання сперміїв більше 100 год. активність ензиму становила $65,2 \pm 1,7$ нмоль/хв×мг протеїну, а до 100 год. була нижча на 26,8 % (P < 0,001; табл. 1). Протягом всього часу інкубування активність АСТ знижувалася.

Таблиця 1

Активність АСТ в еякулятах бугаїв залежно від тривалості виживання сперміїв

Вживання сперміїв, год.	Активність ензиму, нмоль/хв×мг протеїну			
	Доби інкубування:			
	перша	друга	третя	четверта
> 100	$65,2 \pm 1,7$	$58,3 \pm 1,2$	$65,0 \pm 1,2$	$55,1 \pm 2,1^*$
< 100	$46,6 \pm 2,5$	$43,3 \pm 1,1^*$	$36,6 \pm 2,0^{***}$	$20,0 \pm 2,2^{***}$

Примітка: Різниця статистично вірогідна, порівняно з першою добою * – P < 0,05; *** – P < 0,001

Зокрема, за виживання сперміїв до 100 год з $46,6 \pm 2,5$ (перша доба) на 7,1 % (P < 0,05) другої і ще на 15,5 % (P < 0,001) третьої доби і на четверту добу становить $20,0 \pm 2,2$ нмоль/хв×мг протеїну (P < 0,001). За виживання статевих клітин більше 100 год –

активність ензиму вірогідно зменшувалася тільки на четверту добу інкубування (на 15,5 %; $P < 0,05$), порівняно з вихідною величиною значення показника.

Активність АСТ в спермі забезпечують її ізоформи. Так, в досліджених еякулятах бугаїв виявлено два ізоформи АСТ, які в залежності від електрофоретичної рухливості у 7,5 % ПААГ позначили як АСТ1 та АСТ2. Ізоформи АСТ в еякулятах бугаїв відрізнялися за інтенсивністю прояву та площею зафарбованих смуг.

Встановлена відмінність зафарбування свідчить про неоднаковий внесок ізоформів в загальну активність ензиму в еякулятах бугаїв і, відповідно, характеризує якість статевих клітин. Так, для сперми бугаїв з часом виживання спермійів менше 100 та більше 100 год характерний різний вміст ізоформів АСТ (табл. 2). У свіжоотриманих еякулятах з величиною фізіологічного показника більше 100 год, вміст АСТ1-ізоформу вищий на 26,8–30,9 % ($p < 0,001$), ніж за виживання спермійів менше 100 год. ($37,6 \pm 1,45$ %), а вміст АСТ2-ізоформу, навпаки, нижчий.

Таблиця 2

Вміст ізоформів АСТ (%) в свіжоотриманій спермі бугаїв та виживання спермійів

Ізоформи АСТ	Вживання, год		
	<100 n=8	100-144 n=9	>144 n=5
АСТ1	37,6±1,45	64,4±2,03***	68,5±1,80***
АСТ2	62,4±1,80	35,6±2,14***	31,5±1,79***

Примітка: *** - $p < 0,001$ різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальною величиною.

Аналіз кореляції виявив, що між вмістом ізоформів АСТ в свіжоотриманих еякулятах бугаїв та тривалістю виживання статевих клітин існує сильна залежність: для АСТ1 – пряма, а для АСТ2 – обернена. Кореляційне відношення за виживанням спермійів для ізоформів становить: $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,88$ та $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,87$.

Таким чином, співвідношення ізоформів ензиму у свіжоотриманих еякулятах бугаїв є показником тривалості виживання спермійів.

У процесі інкубування сперми співвідношення ізоформів АСТ змінюється. Зокрема, в еякулятах з виживанням спермійів менше 100 год на другу добу інкубування, порівняно з першою, зростає на 16,8 % вміст АСТ1, досягаючи свого максимуму на третю ($61,4 \pm 2,4$ %; $P < 0,001$), а вміст АСТ2, відповідно, знижувався з $65,5 \pm 1,2$ % (перша доба) до $39,0 \pm 2,7$ % (четверта доба; рис. 1).

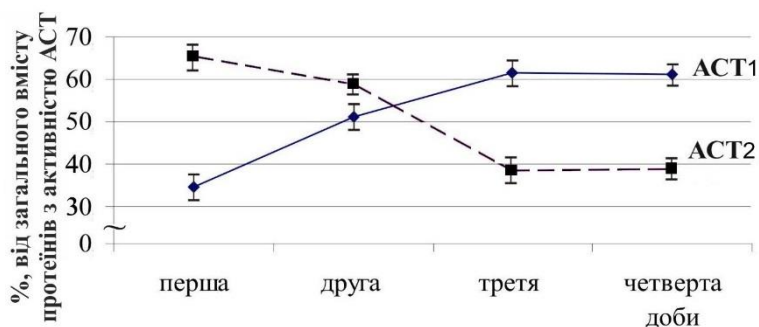


Рис. 1. Вміст ізоформів АСТ в еякулятах з виживанням спермійів менше 100 год

За тривалості виживання спермійів більше 100 год вміст АСТ1 зменшується на 12,9 % на другу, третю добу – повертається до вихідної величини ($65,0 \pm 1,5$ %) і на четверту добу збільшується на 5,8 %, порівняно з першою добою (рис. 2).

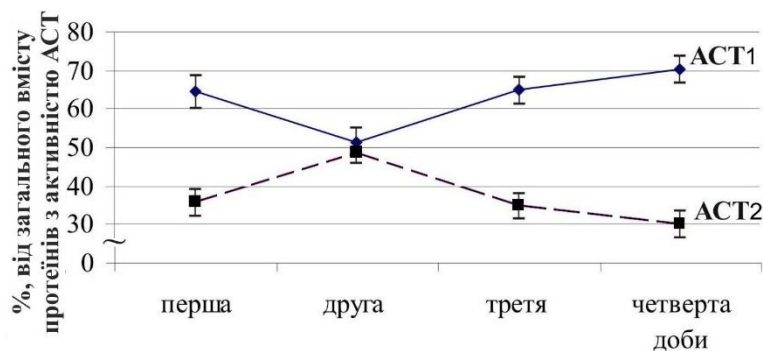


Рис. 2. Вміст ізозимів АСТ в еякулятах з виживанням спермійв більше 100 год.

Отже, у спермі з величиною фізіологічного показника понад 100 год співвідношення ізозимів АСТ змінюється менше ($P < 0,05$), на відміну від еякулятів з виживанням спермійв до 100 год, де відбувається перерозподіл їх вмісту ($P < 0,001$).

Із аналізу кореляції випливає, що між тривалістю виживання спермійв і активністю та вмістом ізозимів АСТ за інкубування сперми існує залежність: для активності АСТ1 – позитивна, а для АСТ2 – негативна. Кореляційне відношення за виживанням спермійв для активності та ізозимів ензиму становить, відповідно, до 100 год – $\eta^2_{\text{АСТ}} = 0,83$; $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,68$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$ і більше 100 год – $\eta^2_{\text{АСТ}} = 0,75$; $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,92$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$.

Отже, еякуляти бугаїв з пониженим виживанням спермійв характеризуються вірогідно нижчою активністю АСТ і, відповідно, швидкістю процесу переамінування амінокислот. Зростання постачання субстратів з цитозолу в мітохондрії статевих клітин забезпечує високе виживання спермійв.

За збільшення часу інкубування еякулятів відбуваються зміни активності та вмісту ізозимів АСТ, які можуть свідчити про оптимізацію забезпечення енергією статевих клітин в процесі виживання, а активність та співвідношення ізозимів ензиму у свіжоотриманій спермі може служити критерієм фізіологічної якості спермійв.

В И С Н О В К И

1. Встановлено, що при виживанні спермійв понад 100 год активність АСТ в свіжоотриманій спермі становила $65,2 \pm 1,7$, а до 100 год. – $46,6 \pm 2,5$ нмоль/хв×мг протейну.
2. В еякулятах бугаїв виявлено два ізозими АСТ, які відрізняються між собою за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю зафарбування у ПААГ.
3. Встановлена кореляція з часом виживання спермійв – сильна пряма для АСТ1 ($\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,88$) та обернена – для АСТ2 ($\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,87$) ізозимів.
4. За інкубування сперми активність та співвідношення ізозимів АСТ змінюються. Кореляційне відношення за часом інкубування еякулятів становить, відповідно, до 100 год – $\eta^2_{\text{АСТ}} = 0,83$; $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,68$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$ і більше 100 год. – $\eta^2_{\text{АСТ}} = 0,75$; $\eta^2_{\text{АСТ1}} = 0,92$ і $\eta^2_{\text{АСТ2}} = 0,69$.

Перспективи досліджень. Вивчити активність і спектр ізозимів аспаратамінотрансферази у розморожених еякулятах бугаїв.

References

- Alfano, J. & Kahn. M. (1993). Isolation and characterization of a gene coding for a novel aspartate aminotransferase from rhizobium meliloti. Journal of Bacteriology. 175. 4186-4196.
- Córdoba, M., Pintos, L.N., Beconi. M.T. (2007). Heparin and quercetin generate differential metabolic pathways that involve aminotransferases and LDH-X dehydrogenase in cryopreserved bovine spermatozoa. Theriogenology. 67. 648-654.

- Gaczarzewicz, D., Piasecka, M., Udała, J., Błaszczyk, B., Stankiewicz, T., Laszczyńska, M. (2010). Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods. *Acta Vet. Hung.* 58. 1. 105-116.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Uçar, M., Ozenç, E. (2004). Relationship between some reproductive parameters and biochemical properties of blood serum in rams. *Arch. Androl.* 50. 6. 387-390.
- Kozdrowski, R. & Dubiel, A. (2004). The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 80. 3-4. 281-289.
- Leung, F.Y. & Henderson, A.R. (1981). Isolation and purification of aspartate aminotransferase isoenzymes from human liver by chromatography and isoelectric focusing. *Clin. Chem.* 27. 2. 232-235.
- Mitchell, M., Cashman, K. S., Gardner, D., Thompson, J., Lane, M. (2009). Disruption of Mitochondrial Malate-Aspartate Shuttle Activity in Mouse Blastocysts Impairs Viability and Fetal Growth. *Biology of Reproduction.* 80. 2. 295-301.
- Nizański, W., Dubiel, A., Bielas, W., Dejneka, G.J. (2001). Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *Reprod. Fertil. Suppl.* 57. 365-369.
- Reitmann, S.A. & Frankel, S. (1957). Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Path.* 28. 1. 56 – 63.
- Severin, E.S. (2003). *Biochemistry. Moskva. Mir.* 119-124. [in Russian].