АКТИВНІСТЬ ТА ІЗОФОРМИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ У ТКАНИНАХ РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ

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

¹Інститут біології тварин НААН
вул. Стуса, 38, 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 супероксиддисмутази в сім'яниках, придатку та епідидимальних сперміях статевозрілих самців щурів.

Досліди проводили на статевозрілих самцях щурів (вік 5 - 6 місяців). Після декапітації відбирали сім'яники та придатки сім'яників, з яких вимивали спермії 0,9 % розчином натрію хлориду. У супернатанті та суспензії спермій визначали вміст загального протеїну і активність супероксиддисмутази (СОД). Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу у 10 % поліакриламідному гелі шляхом специфічного фарбування пластин гелю нітросинім тетразолієм.

Встановлено, що найвищою активністю характеризується тканина сім'яника ($18,2 \pm 2,59$ МО/мг протеїну), меншою на 34,6 % - придатка і найменшою на 46,7 % - епідидимальні спермії.

Електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі і специфічним фарбуванням у тканинах сім'яника, придатка і епідидимальних сперміях щурів виявлено п'ять основних ізоформ СОД, які, залежно від швидкості руху в ПААГ, позначили, від максимально до найменш рухливої, як S1, S2, S3, S4 і S5. Особливістю тканини сім'яника є присутність двох мінорних ізоформ (S1a- і S1b-ізоформ), які характеризуються високою електрофоретичною рухливістю та меншою інтенсивністю проявлення, забарвлення з часом зникає, на відміну від інших протеїнів ензиму.

Встановлено, що ізоензимний спектр СОД характеризується тканинною специфічністю та залежить від фізіологічних і функціональних особливостей тканини репродуктивних органів самців і спермій. У тканині сім'яника найбільше S2-ізоформи – $36,7 \pm 1,91$ %, менше, і майже однаковий вміст S1-, S3- і S4-ізоформ ($18,0 \pm 3,27$, $19,3 \pm 3,98$ і $15,7 \pm 2,15$ %) та найменше – S5-, S1a- і S1b-ізоформ ($6,2 \pm 1,20$, $2,2 \pm 0,03$ і $1,9 \pm 0,01$ %). У тканині придатка, порівняно зі сім'яником, вміст S3-ізоформи вищий на 17,9 %, а S2- і S1- менший, відповідно, на 7,9 і 4,9 %. Для ізоензимів СОД епідидимальних спермій характерний високий вміст S2-ізоформи, що більше на 11,2 %, ніж в сім'янику, а вміст S1-ізоформи, навпаки, менший на 10,0 %. Встановлені відмінності вмісту та активності окремих ізоформ ензиму свідчать про існування тканинної специфічності протеїнів СОД, зумовленої функціональними особливостями досліджених тканин. Оптимальний захист спермій від $O_2^{\cdot -}$ в процесі їх

диференціювання і дозрівання забезпечується активністю різних ізоформ СОД, що підтверджують встановлені різниці в ізоензимному спектрі.

Ключові слова: СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ІЗОФОРМИ, РЕПРОДУКТИВНІ ОРГАНИ, СПЕРМІЇ, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ.

THE ACTIVITY AND ISOFORMS OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN TISSUES OF REPRODUCTIVE ORGANS OF RATS

N. Kuzmina¹, D. Ostapiv¹, A. Chajkovska², A. Panych²

¹Institute of Animal Biology of NAAS,
38, Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine
oddost@ukr.net

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

The activity of superoxide dismutase, the content of its isoforms in testis, epididymis, and in epididymal spermatozoa of pubescent rat males were studied.

The experiments were performed on adult male rats (age 5 - 6 months). After decapitation, the testes and the epididymis were taken, from which the spermatozoa were washed with 0.9 % sodium chloride solution. The total protein and activity of superoxide dismutase (SOD) were determined in the supernatant and the sperm suspension. SOD isoforms were detected after electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel by specific staining of gel plates with nitrosine tetrazolium.

The highest activity was found to be in the tissue of the testes (18.2 ± 2.59 IU/mg of protein), less on 34.6% in the epididymis and the lowest on 46.7% in epididymal sperm.

Electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel and specific staining in the tissues of testis, epididymis, and epididymal sperm of rats revealed five major SOD isoforms, which, depending on the speed of movement in PAAG, were labeled, from maximum to least mobile, such as S1, S2, S3, S4 and S5. The specificity of testicular tissue is the presence of two minor isoforms (S1a- and S1b-isoforms), which are characterized by high electrophoretic mobility and lower intensity of manifestation, and the color disappears over time, unlike other proteins of the enzyme.

It was found that the SOD isoenzyme spectrum is characterized by tissue specificity and depended on the physiological and functional features of the tissue of the reproductive organs of males and spermatozoa. In the testis tissue, S2 isoform was in the largest amount – $36.7 \pm 1.91\%$, less and almost the same content of S1-, S3- and S4-isoforms (18.0 ± 3.27 , 19.3 ± 3.98 and $15.7 \pm 2.15\%$) and the least – S5-, S1a- and S1b-isoform ($6.2 \pm 1.20\%$; 2.2 ± 0.03 and $1.9 \pm 0.01\%$). In the epididymis tissue, the content of the S3-isoform was higher on 17.9% and S2- and S1- respectively on 7.9% and 4.9%, respectively, compared to the testis. SOD isoenzymes of epididymal spermatozoa are characterized by a high content of S2 isoforms, which is more on 11.2% than in the testis, and the content of S1 isoforms, by contrast, is lower on 10.0%. The established differences in the content and activity of individual isoforms of the enzyme indicate the existence of tissue specificity of SOD proteins, due to the functional characteristics of the studied tissues. Optimal protection of sperm from $O_2^{\cdot -}$ in the process of their differentiation and maturation is ensured by the activity of different SOD isoforms, confirming the established differences in the isoenzyme spectrum.

Keywords: SUPEROXIDE DISMUTASE, ISOFORMS, REPRODUCTIVE ORGANS, SPERMATOZOA, ELECTROPHORESIS.

Фізіологія репродуктивної системи самців тісно пов'язана з інтенсивністю окисного метаболізму – синтезом і використанням АТФ, утворенням і нагромадженням активних форм

Оксигену (АФО) та їх утилізацією. Вміст АФО на оптимальному рівні підтримується багатокомпонентною антиоксидантною системою, ключову роль в якій відіграють ензими, а саме супероксиддисмутаза (СОД). В репродуктивних органах самців, як і у інших тканинах, ензим існує у трьох генетично зумовлених формах – мітохондрійній, цитозольній і позаклітинній (Antonyuk et al., 2009). Інтенсивність утворення та знищення АФО 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 (Marnett, 2000). Найнижча активність вказаного ензиму встановлена у 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 виживання спермій в еякуляті (Kuzmina et al., 2010). Отже, для встановлення особливостей функціонування репродуктивних органів самців важливим є не тільки констатування змін загальної активності СОД, але й перерозподіл її ізоформ в процесі сперміогенезу і дозрівання статевих клітин, а після еякуляції, їх існування.

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

Матеріали і 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 pH 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 спермій визначали вміст загального протеїну (Lowry et al., 1951) і активність СОД (Chevari et al., 1991). Ізоформи СОД виявляли після електрофорезу у 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 протеїну 50-100 мкг). Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp і Fridovich (Beauchamp & Fridovich, 1971) у нашій модифікації (Kuz'mina et al., 2008): після електрофорезу ПААГ пластини занурювали в розчин, що містив 1,23 мМ нітросинього тетразолію (НСТ) в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, (pH 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 (pH 7,8). Інкубували в темноті протягом 20 хв. Після чого пластини гелю промивали дистильованою водою і витримували 7 хв. під ультрафіолетом для генерації $O_2^{\cdot-}$ рибофлавіном. У результаті фотохімічної реакції відновлення НСТ до нітроформаза супероксидними аніон-радикалами пластини набували темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими внаслідок перетворення супероксид аніон-радикалів СОД.

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

Таблиця 1

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

Активність СОД	Тканини		Епідидимальні спермії
	сім'яника	придатка	
МО/мг протеїну	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

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

Така закономірність змін активності СОД зумовлена тим, що в тканині сім'яника, де проходить сперміогенез, в сперміях деконденсований хроматин і супероксиданіон радикали ($O_2^{\cdot-}$) здатні руйнувати вуглецеві зв'язки між основами, ініціювати процес пероксидації ДНК (Bucak et al., 2007) і розриви її спіралі (Thomson et al., 2009). 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 в збільшенні вмісту внутрішньоклітинного цАМФ і запуску каскаду реакцій фосфорилування тирозину, що забезпечує капацитацію і акросомну реакцію та здатність запліднювати ооцит. У спермії з епідидиміса понижений антиоксидантний захист зумовлений фізіологічними особливостями підготовки статевих клітин до запліднення ооцита (процесу капацитації) (Du Plessis et al., 2015) для яких характерний підвищений рівень окиснення поліненасичених жирних кислот (ПЖК) ліпідів цитоплазматичних мембран (Sakkas & Alvarez, 2010) та інтенсивна генерація $O_2^{\cdot-}$ ланками ланцюга дихання мітохондрій (Nowicka-Bauer & Nixon, 2020).

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

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

Крім того, у тканині сім'яника нижче S1-фракції СОД, безпосередньо після фарбування, проявляються ще дві мінорні ізоформи, які характеризуються вищою електрофоретичною рухливістю та меншою інтенсивністю проявлення, яке з часом зникає, на відміну від інших фракцій протеїнів ензиму. Тобто, в тканині сім'яника щурів присутні білки з СОД-активністю, які швидко втрачають свою каталітичну здатність.

Аналізом вмісту ізоформ ензиму встановлено, що у тканині сім'яника найбільше S2-ізоформи – $36,7 \pm 1,91$ %, менше, і майже однаковий вміст S1-, S3- і S4-ізоформ ($18,0 \pm 3,27$, $19,3 \pm 3,98$ і $15,7 \pm 2,15$ %) та найменше – S5-, S1a- і S16-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 S2- і S1- менший, відповідно, на 7,9 % і 4,9 %. За вмістом S5- і S4-ізоформ досліджені тканини не відрізнялись. Для ізоензимів СОД епідидимальних спермій характерний високий вміст S2-ізоформи, що більше на 11,2 %, ніж у сім'янику і на 19,1 %, ніж у придатку, а вміст S1-ізоформи, навпаки, менший на 10,0 і 5,1 %, відповідно. Вміст S3-ізоформи СОД спермій нижчий на 11,7 %, порівняно з тканиною придатка, а S5-ізоформи менший на 3,4 % від тканини сім'яника. Вміст S4-ізоформи в сперміях майже однаковий, порівняно з досліджуваними тканинами.

Таблиця 2

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

СОД	Вміст ізоформ, %		
	Тканина		епідидимальні спермії
	сім'яник	придаток	
S5	6,2±1,20	4,7±1,46	2,9±0,46*
S4	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 [#]
S2	36,7±1,91	28,8±2,10*	47,9±1,52***
S1	15,7±2,15	10,8±0,73*	5,7±1,97***
S1a	2,2±0,03	-	-
S1б	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

Подібний склад активних протеїнів СОД встановлено при вивченні сперми інших видів тварин (бугая, кнура) та чоловіка (Kuzmina et al., 2010). При цьому, переважання S2-ізоформи у загальному спектрі протеїнів ензиму виявляє вплив на фізіологічні характеристики спермій: її вміст проявляє позитивну, середньої сили кореляцію з виживанням статевих клітин у свіжоотриманих еякулятах (Kuzmina et al., 2010).

З результатів аналізу загальної активності СОД та відсоткової частки кожної ізоформи ензиму в досліджуваному матеріалі репродуктивної системи самців щурів впливає, що активність S2-ізоформи найвища в тканині сім'яника (6,7±0,34 МО/мг протеїну), нижча на 31,3 % – в епідидимальних сперміях і найменша – в тканині придатка (3,4±0,12 МО/мг протеїну) (табл. 3). S3-ізоформа, навпаки, проявляє найбільшу активність в тканині придатка (4,4±0,27 МО/мг протеїну) і меншу в сім'янику та епідидимальних сперміях, відповідно, на 20,4 і 40,1%. Активність S5-, S4- і S1-ізоформ знижується від сім'яника до придатка та епідидимальних спермій з 1,1±0,42, 3,3±0,26 і 2,9±0,13 МО/мг протеїну, 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 в тканинах репродуктивних органів і сперміях щурів, n=9; M±m

Ізоформи СОД	Активність супероксиддисмутази, МО/мг протеїну		
	тканина		епідидимальні спермії
	сім'яник	придаток	
S5	1,1±0,42	0,6±0,07***	0,3±0,02***
S4	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 ^{##}
S2	6,7±0,34	3,4±0,12***	4,6±0,19***
S1	2,9±0,13	1,3±0,09***	0,6±0,04***
S1a	0,4±0,01	-	-
S1б	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.

ВИСНОВКИ

Отже, поряд з різницею в загальній активності супероксиддисмутази, встановлені відмінності вмісту та активності окремих ізоформ ензиму свідчать про існування тканинної специфічності протеїнів СОД, зумовленої функціональними особливостями досліджених тканин. Оптимальний захист спермій від O₂⁻ в процесі їх диференціювання і дозрівання

забезпечується активністю різних ізоформ СОД, що підтверджують встановлені різниці в ізоензимному спектрі.

Перспективи досліджень. Вивчити залежність запліднювальної здатності спермій від вмісту ізозимів супероксиддисмутази.

References

Antonyuk, S.V., Strange, R.W., Mark, S.L., Samar, H.S. (2009). The structure of human extracellular copper–zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. *Journal of molecular Biology*, 388, 310–326.

Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.* 44, 276–287.

Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67, 1060–1067.

Chevari, S. N., Andyan, T. A. Shtrenger, Ya. I. (1991). Opredeleniye antioksidantnikh parametrov krovi i ikh diagnosticheskoye znacheniye v pozhilom vozraste. *Lab. Delo*, 10, 9–13 [in Russian].

Colagar, A.H. & Marzony, E.T. (2009). Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(2), 144–149.

Du Plessis, S., Agarwal, A., Halabi, J., Tvrdá, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32, 509–520.

Kuzmina, N.V. & Ostapiv, D. D. (2008). Aktyvnist superoksyddysmutazy i hlutationperoksydazy v riznykh orhanakh i krovi koriv. *Biolohiya tvaryn*, 12, 423–429 [in Ukrainian].

Kuzmina, N.V. Ostapiv, D.D., Huleyuk, N.L., Humenets'kyi, I. Ye (2010). Vydovi ta individualni osoblyvosti izoenzymiv superoksyddysmutazy spermy. *Ukr. biokhim. Zhurn*, 82, 85–86 [in Ukrainian].

Kuzmina, N. V., Ostapiv, D. D., Yaremchuk, I. M. (2010). Izoenzymnyy spektr superoksyddysmutazy v protsesi inkubuvannya eyakulyativ buhayiv. *Biolohiya tvaryn*, 12, 423–429 [in Ukrainian].

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fair, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193(1), 264–275.

Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. (2000). *Carcinogenesis*. 21, 361–370.

Nowicka-Bauer, K. & Nixon, B. (2020). Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants (Basel)*. 9(2), <https://doi.org/10.3390/antiox9020134>.

Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*, 93, 1027–1036.

Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., et al. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum. Reprod*, 24, 2061–2070.