

## ЗВ'ЯЗОК АКТИВНОСТІ ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ З ВМІСТОМ ЛІПОПРОТЕЇНІВ СПЕРМИ БУГАЇВ

С. Й. Кава<sup>1</sup>, Д. Д. Остапів<sup>2</sup>, І. М. Яремчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького

<sup>2</sup>Інститут біології тварин НААН

*Вивчали вміст ліпопротеїнів сперми у зв'язку з активністю цитохромоксидази еякулятів бугаїв. Встановлено, що для свіжоотриманих еякулятів характерні: об'єм —  $4,3 \pm 0,18$  мл, концентрація —  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  клітин/мл й активність —  $7,4 \pm 0,16$  бали сперміїв. Сперма бугаїв містить основні фракції ліпопротеїнів: хіломікрони ( $26,5 \pm 2,20$  %), дуже низької щільності —  $10,4 \pm 0,44$  %, низької —  $18,3 \pm 1,84$  %, високої —  $17,1 \pm 1,09$  % та дуже високої щільності —  $26,8 \pm 1,94$  %, а спермії проявляють активність цитохромоксидази  $36,7 \pm 2,66$  од/(год.  $\times 0,1$  мл сперми). Між активністю цитохромоксидази і вмістом хіломікрон та ліпопротеїнів дуже низької щільності ( $\eta = 0,352$  та  $0,438$ ) існує середньої сили негативна кореляція, а з ліпопротеїнами дуже високої щільності — позитивна сильна ( $\eta = 0,674$ ).*

Після еякуляції густа маса сперміїв, розріджена секретами додаткових статевих залоз, забезпечується субстратами окиснення і статеві клітини набувають здатність до прямолінійно-поступального руху. Енергію для руху спермії бугаїв отримують шляхом використання присутніх в плазмі сперми вуглеводів, ліпідів та білків, а одним із основних біохімічних процесів, за рахунок якого ресинтезується АТФ, є дихання [5, 6]. При цьому, інтенсивність використання субстратів окремими ланками ланцюга дихання є маркерами фізіологічних якостей і запліднювальної здатності статевих клітин [2]. Зокрема, активність цитохромоксидази позитивно корелює з концентрацією сперміїв, їх виживанням у свіжоотриманих та розморожених еякулятах і запліднювальною здатністю [1].

Оскільки спермії здатні для свого руху використовувати в якості субстратів ліпіди, вивчали зв'язок між активністю цитохромоксидази та вмістом ліпопротеїнів сперми бугаїв.

**Матеріали і методи.** Досліджували еякуляти бугаїв, які належать ТЗОВ «Західплемресурси». Сперму отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників — дуплетна садка два рази на тиждень, через дві-три доби. У свіжоотриманих еякулятах, оцінених за фізіологічними показниками (об'ємом, мл; активності (рухливості) сперміїв, бали; та концентрацією,  $10^9$  клітин в мл) вивчали: активність цитохромоксидази (ЦХО; цитохром С :  $O_2$  – оксидоредуктаза, КФ. 1.9.3.1.) — вносили у пробірку 0,5 мл сперми розрідженої 1:4 лактозо-жовтковим розбавлювачем, 2,5 мл реактиву “наді”. Суміш інкубували протягом 1 год. при температурі 37–38 °С. Паралельно з дослідними пробами готували контрольну, в якій інкубували 0,4 мл розріджувача з реактивом “наді”. Активність ферменту виражали в умовних одиницях екстинкції (од/(год. $\times 0,1$  мл С) — різницю між дослідною і контрольною пробою множили на 100 і одержану величину приймали за активність цитохромоксидази [4]; вміст фракцій ліпопротеїнів визначали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ), для чого формували пластини ПААГ з градієнтом концентрацій акриламиду: 3,5, 5,0 та 7,5 %. Для електрофорезу попередньо зразки сперми фарбували (до 0,1мл свіжоотриманої сперми додавали 0,03 мл 0,1 % розчин фарб Судан III + Судан IV (1:1) у 70 % етиловому спирті) і 30 хв. інкубування в темноті. В лунки концентруючого гелю вносили 0,07 мл суміші. Кількісний аналіз і визначення вмісту

ліпопротеїнів (%) проводили прямим скануванням гелів на аналізаторі електрофореграм "АФ-1", довжина хвилі 610 нм. Статистичний аналіз отриманого цифрового матеріалу проведено за Плохінським М. О. [3].

**Результати й обговорення.** Еякуляти бугаїв характеризуються: об'ємом  $4,3 \pm 0,18$  мл, концентрацією статевих клітин  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  клітин/мл, а спермії проявляють активність  $7,4 \pm 0,16$  бали. При цьому, активність ЦХО становить  $36,7 \pm 2,66$  од/(год  $\times$  0,1 мл С, вміст фракцій ліпопротеїнів (відповідно до білків сироватки крові): хіломікрон (ХМ)  $26,9 \pm 1,93$  %, ліпопротеїнів (ЛП) дуже низької щільності (ДНЩ) —  $10,4 \pm 0,44$  %, низької (НЩ) —  $18,3 \pm 1,84$  %, високої (ВЩ) —  $17,1 \pm 1,09$  % та дуже високої щільності (ДВЩ) —  $26,8 \pm 1,94$  %.

Вміст ліпопротеїнів залежить від активності цитохромоксидази. Так, при низькій активності ферменту (менше 30,0 од) вміст хіломікрон становить  $24,3 \pm 3,80$  %, нижчий на 3,2 % при 30,0–50,0 од і ще нижчий — на 11,5 % ( $p < 0,01$ ) при активності більше 50,0 од (табл.).

Таблиця

**Зв'язок активності цитохромоксидази з вмістом ліпопротеїнів сперми**

Ліпопротеїни (ЛП), %	Цитохромоксидаза, од/(год $\times$ 0,1 мл сперми)						$\eta$
	< 30,0		30,0 – 50,0		> 50,0		
	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	
ХМ	24	$24,3 \pm 3,80^{***}$	17	$21,1 \pm 3,91^{**}$	7	$9,6 \pm 1,86$	0,352
ЛПДНЩ	24	$6,9 \pm 0,78^{**}$	16	$8,5 \pm 0,91^{***}$	7	$3,5 \pm 0,54$	0,438
ЛПНЩ	24	$21,3 \pm 2,21$	17	$23,6 \pm 4,82$	7	$19,6 \pm 5,93$	0,148
ЛПВЩ	22	$21,8 \pm 2,02$	16	$19,9 \pm 2,03$	6	$18,2 \pm 2,81$	0,039
ЛПДВЩ	17	$22,1 \pm 2,31$	15	$27,1 \pm 2,72$	4	$47,5 \pm 9,10^{**}$	0,674

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальною величиною значення - \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Кореляційне відношення за активністю цитохромоксидази для вмісту хіломікрон  $\eta = 0,352$ . Оскільки за своїм походженням хіломікрони є екзогенні ліпопротеїни й головною функцією їх є транспорт ліпідів, очевидно ліпідна частина ХМ (можливо й білкова) інтенсивно використовуються сперміями, як енергетичний матеріал, для ресинтезу АТФ.

Вміст ліпопротеїнів дуже низької щільності за активності ферменту менше 30,0 од становить  $6,9 \pm 0,78$  %, зростає на 1,6 % при 30,0–50,0 од і знижується на 5,0 % ( $p < 0,001$ ) при максимальній величині ЦХО (більше 50,0 од). Кореляційне відношення за активністю цитохромоксидази для вмісту ліпопротеїнів дуже низької щільності  $\eta = 0,438$ . Оскільки ЛПДНЩ подібні за своїм складом до хіломікрон, однак синтезуються в організмі і містять невелику кількість вуглеводів (галактози, манози, фруктози, глюкозаміна та сіалових кислот), ймовірно, вони, аналогічно хіломікронам, є джерелом субстратів окиснення для ресинтезу АТФ сперміями.

Активність ЦХО проявляє слабкий зв'язок із вмістом ліпопротеїнів низької щільності. Так, за низької (менше 30,0 од) та високої (більше 50,0 од) активності ферменту вміст вказаної фракції ліпопротеїнів майже однаковий (19,6–21,3%), а при активності 30,0–50,0 од ЦХО вищий на 2,3 - 4,0%. Кореляційне відношення за активністю цитохромоксидази для вмісту ліпопротеїнів низької щільності  $\eta = 0,148$ .

Аналогічно, слабку залежність від ЦХО проявляє вміст ліпопротеїнів високої щільності. Так, за активності ЦХО менше 30,0 од величина значення  $21,8 \pm 2,02$  % при 30,0–50,0 од знижується на 1,9 % і при активності більше 50,0 од становить  $18,2 \pm 2,81$  %, що нижче попереднього на 1,7 % та вихідного на 3,6 %. Кореляційне відношення за активністю цитохромоксидази для вмісту ліпопротеїнів високої щільності  $\eta = 0,039$ .

ЦХО позитивно корелює з вмістом ліпопротеїнів дуже високої щільності. Зокрема, за активності ферменту менше 30,0 од. проявляється низький вміст вказаної фракції

( $22,1 \pm 2,31\%$ ), за  $30,0\text{--}50,0$  од. — зростає на  $5,0\%$  і при максимальній активності (більше  $50,0$  од) становить  $47,5 \pm 9,10\%$ , що вище вихідного значення на  $25,4\%$  ( $p < 0,01$ ). Отже, між активністю ЦХО та вмістом ЛПДВЩ у спермі бугаїв існує позитивна кореляція. Кореляційне відношення за активністю цитохромоксидази для вмісту ліпопротеїнів дуже високої щільності  $\eta = 0,674$ . Ймовірно, позитивна кореляція між активністю ЦХО і ЛПДВЩ зумовлена нагромадженням продуктів окиснення ХМ та ЛПДНЩ, наслідком чого є зменшення розміру молекули ліпопротеїнів і зростанням їх електрофоретичної рухливості.

Підсумовуючи результати аналізу кореляцій між активністю ЦХО та вмістом ліпопротеїнів можна стверджувати, що кореляції середньої сили негативна між ферментом і вмістом хіломікрон та ліпопротеїнів дуже низької щільності ( $\eta = 0,352$  та  $0,438$ ) і позитивна сильна з ліпопротеїнами дуже високої щільності ( $\eta = 0,674$ ) зумовлені, з одного боку, використанням компонентів ліпопротеїнів (ліпідів і білків), як субстратів для ресинтезу АТФ в ланцюгу дихання сперміїв, а з другого, як наслідок, нагромадження продуктів їх розщеплення в спермі.

## ВИСНОВКИ

1. Еякуляти бугаїв характеризуються: об'ємом  $4,3 \pm 0,18$  мл, концентрацією статевих клітин  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  клітин/мл, а спермії проявляють активність  $7,4 \pm 0,16$  бали, активність цитохромоксидази  $36,7 \pm 2,66$  од/(год.  $\times 0,1$  мл сперми).

2. У свіжоотриманих еякулятах вміст хіломікрон становить  $26,9 \pm 1,93\%$ , ліпопротеїнів дуже низької щільності —  $10,4 \pm 0,44\%$ , низької —  $18,3 \pm 1,84\%$ , високої —  $17,1 \pm 1,09\%$  та дуже високої щільності —  $26,8 \pm 1,94\%$ .

3. Між активністю цитохромоксидази і вмістом хіломікрон та ліпопротеїнів дуже низької щільності існує середньої сили негативна кореляція ( $\eta = 0,352$  та  $0,438$ ), а з ліпопротеїнами дуже високої щільності — позитивна сильна ( $\eta = 0,674$ ).

**Перспективи подальших досліджень.** Буде досліджуватися вміст ліпопротеїнових комплексів сперми залежно від складу розріджувачів еякулятів бугаїв.

## CORRELATION BETWEEN CYTOCHROMOXIDASE ACTIVITY AND CONTENT OF LIPOPROTEINS IN THE BULLS SPERM

*S. Y. Kava<sup>1</sup>, D. D. Ostapiv<sup>2</sup>, I. M. Yaremchuk<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytsky

<sup>2</sup>Institute of Animal Biology of NAAS

## SUMMARY

Sperm lipoprotein content in connection with cytochromoxidase activity in bull's ejaculate was studied. It was established, that fresh obtained can be ejaculates characterized by: volume  $4,3 \pm 0,18$  ml, concentration —  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  cell/ml and movement activity —  $7,4 \pm 0,16$  points. Bull semen contains main lipoprotein fractions: hylomicrons ( $26,5 \pm 2,20\%$ ), very low density —  $10,4 \pm 0,44\%$ , low —  $18,3 \pm 1,84\%$ , high —  $17,1 \pm 1,09\%$  and vey high density —  $26,8 \pm 1,94\%$ , and spermatozoa have cytochromoxidase activity  $36,7 \pm 2,66$  points/(hour  $\times 0,1$  sperm ml). Between cytochromoxidase activity and content of hylomicron and lipoproteins with low density ( $\eta = 0,352$  and  $0,438$ ) there is negative correlation with average force, and with high density lipoproteins — positive strong correlation ( $\eta = 0,674$ ).

## СВЯЗЬ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПОПРОТЕИНОВ СПЕРМЫ БЫКОВ

С. И. Кава<sup>1</sup>, Д. Д. Остапів<sup>2</sup>, И. М. Яремчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицького

<sup>2</sup>Институт биологии животных НААН

### А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали содержание липопротеинов спермы в связи с активностью цитохромоксидазы эякулятов быков. Выявлено, что для свежеполученных эякулятов характерны физиологические показатели: объем  $4,3 \pm 0,18$  мл, концентрация половых клеток  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  /мл, а активность спермиев —  $7,4 \pm 0,16$  балла. Сперма быков содержит основные фракции липопротеинов: хиломикроны ( $26,5 \pm 2,20$  %), липопротеины очень низкой плотности —  $10,4 \pm 0,44$  %, низкой —  $18,3 \pm 1,84$  %, высокой —  $17,1 \pm 1,09$  % и очень высокой плотности —  $26,8 \pm 1,94$  %, а спермии проявляют  $36,7 \pm 2,66$  ед/(ч  $\times$  0,1 мл С) активность цитохромоксидазы. Между активностью цитохромоксидазы и содержанием хиломикрон и липопротеинов очень низкой плотности ( $\eta = 0,352$  и  $0,438$ ) существует средней силы отрицательная корреляция, а с липопротеинами очень высокой плотности — положительная сильная ( $\eta = 0,674$ ).

### Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Зверева Г. В. Активность окислительных ферментов в сперме быков и оплодотворяющая способность спермиев. / Зверева Г. В., Чухрий Б. Н., Клевец Л. А. // Докл. ВАСХНИЛ. — 1981. — № 12. — С. 19–20.
2. Косенко М. В. Репродуктивна функція і андрологічна диспансеризація бугаїв / М. В. Косенко, Б. М. Чухрій, І. Я Коцюмбас та ін. — Львів, 2007. — 186 с.
3. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников. / Н. А. Плохинский — М.: Колос., 1969. — 255 с.
4. Чухрій Б. М. До методики визначення активності окислювальних ферментів у спермі бугаїв / Чухрій Б. М., Клевец Л. О. // Розведення та штучне осіменіння великої рогатої худоби. — Київ, 1978. — Вип. 10. — С. 42–45.
5. Шергин Н. П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных / Шергин Н. П. — М.: Колос, 1967. — 239 с.
6. Яблонський В. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / В. А. Яблонський, С. П. Хомин, В. І. Завірюха та ін. — Львів: Афіша, 2009. — 218 с.