

of cytogenetic indicators in breeding pigs] *Genetics produktivnosti tvarin: Vseukr. Yuvileyna conference. Prisyachena 90-h richchyu narodzhennya vidatnogo vchenogo Kolesnika* MM [Proc. of the Genetics Animal Productivity: All-Ukrainian anniversary conference. Dedicated to the

90th anniversary of the famous scientist M. Kolesnik]. Kiev, 1994, pp. 8 (In Ukrainian).

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України.

УДК 577.15:612.616.2.

ЗВ'ЯЗКИ МІЖ АКТИВНІСТЮ І ВМІСТОМ ІЗОФОРМ ЕНЗИМІВ МАЛАТ-АСПАРТАТНОГО ШУНТА В ЕЯКУЛЯТАХ ТА ВИЖИВАННЯМ СПЕРМІЇВ

Н. В. Кузьміна
inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН, м. Львів, вул. Стуса, 38, Львів 79034

Вивчали кореляції між активністю та вмістом ізоформ малатдегідрогенази (МДГ) і аспаратамінотрансферази (АСТ) з виживанням сперміїв чоловіків, кнурів і бугаїв. Встановлено, що активність МДГ і АСТ в еякулятах проявляє видову специфічність та становить: у чоловіка, відповідно, $0,35 \pm 0,09$ і $70,0 \pm 5,10$, кнура — $0,27 \pm 0,09$ і $53,3 \pm 8,8$ та бугая $28,0 \pm 5,03$ і $63,2 \pm 6,30$ нмоль/хв \times мг протеїну. Вміст МДГ1 ізоформи проявляє слабку видову специфічність (21,5–28,2 %), МДГ2 — значно вищу ($77,2 \pm 5,77$ % в чоловіка та $22,2$ – $28,2$ % в кнура і бугая), МДГ3 відсутня в чоловіка, а в кнура та бугая майже однакова (50,3 і 49,8 %). Вміст АСТ1 в еякулятах чоловіка високий ($59,2 \pm 10,10$ %) і нижчий на 7,5–7,6 % у кнура та бугая ($p < 0,05$) і, навпаки, АСТ2 у других — вищий (48,3–48,4 %) і нижчий на 7,5–7,6 % ($p < 0,05$) у чоловіка. Встановлений сильний позитивний зв'язок за активністю МДГ для виживання сперміїв в еякулятах кнура ($\eta = 0,807$) і бугая ($\eta = 0,745$) та середньої сили в чоловіка ($\eta = 0,559$). Для виживання сперміїв за активністю АСТ існує сильна позитивна кореляція в еякулятах чоловіка ($\eta = 0,742$), середньої сили — в бугая ($\eta = 0,330$) і негативна середньої сили — у кнура ($\eta = 0,532$). Кореляційне відношення за вмістом АСТ1

ізоформи для виживання сперміїв всіх видів самців позитивне: чоловіка — $\eta = 0,657$, бугая — $\eta = 0,639$ і кнура — $\eta = 0,769$, а за вмістом АСТ2 — негативне, відповідно, $\eta = 0,740$, $0,586$, $0,722$. Вміст МДГ1 ізоформи проявляє сильну позитивну кореляцію з виживанням статевих клітин сперми чоловіка ($\eta = 0,843$), середньої сили — кнура ($\eta = 0,688$) і слабку — бугая ($\eta = 0,254$). Існує негативний зв'язок між вмістом МДГ2 ізоформи та виживанням сперміїв чоловіка, кнура і бугая, відповідно, $\eta = 0,559$, $0,846$ і $0,555$. МДГ3 проявляє сильну позитивну кореляцію з виживанням статевих клітин в еякулятах кнура ($\eta = 0,785$) та середньої сили в бугая ($\eta = 0,639$). Сильні позитивні кореляції між активністю ензимів, їх ізоформами і виживанням сперміїв свідчать про необхідність використання вивчених біохімічних показників для оцінювання фізіологічної якості і прогнозування запліднювальної здатності статевих клітин.

Ключові слова:
АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗА, ІЗОФОРМИ,
МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗА, ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ, КОРЕЛЯЦІЙНЕ
ВІДНОШЕННЯ

RELATIONS BETWEEN ACTIVITY AND CONTENT OF ENZYME MALATE-ASPARTATE SHUTTLE ISOFORMS IN THE EJACULATE AND SURVIVAL OF SPERMATOZOA

N. V. Kuzmina
inenbiol@mail.lviv.ua

Institute of animal biology of NAAS, Lviv, 38 Stus Str. 79034, Ukrainian

We studied the correlation between the activity and malate dehydrogenase (MDH) and aspartate aminotransferase (AST) isoform content and the survival of human, boar and bull sperm. It is found that the activity of MDH and AST in the ejaculate exhibits species specificity and are, respectively: human, $0,35 \pm 0,09$ and $70,0 \pm 5,10$; boar — $0,27 \pm 0,09$ and $53,3 \pm 8,8$ and bull $28,0 \pm 5,03$ and $63,2 \pm 6,30$ nmol/min × mg protein. Content of MDH1 isoform shows a weak species specificity (21,5–28,2%), MDH2 — significantly higher (77,2 ± 5,77% — a man and 22,2–28,2% in boar and bull) MDH3 is absent in man and in boar and bull almost identical (50,3 and 49,8%). Content of AST1 in male ejaculate is high (59,2 ± 10,10%) and lower in boar and bull by 7,5–7,6% ($p > 0,05$) and, conversely, AST2 in boar and bull sperm — higher (48,3–48,4%) and lower for 7,5–7,6% ($p > 0,05$) in human. There is a strong positive relationship between MDH activity and the survival of spermatozoa in ejaculates of boar ($\eta = 0,807$) and bull ($\eta = 0,745$) and average relationship force in man ($\eta = 0,559$). Between the survival of spermatozoa and AST activity there is a strong positive correlation in men ejaculates ($\eta = 0,742$), moderate strength — in bull ($\eta = 0,330$) and a negative average force — in boar ($\eta = 0,532$). Correlation relation between the content of AST1

isoforms and survival of sperm in all males is positive: in human — $\eta = 0,657$, bull — $\eta = 0,639$ and boar — $\eta = 0,769$ and content of AST2 — negative, respectively: $\eta = 0,740$; 0,586; 0,722. Content of MDH1 isoform shows a strong positive correlation with spermatozoa survival in human ($\eta = 0,843$), moderate strength — boar ($\eta = 0,688$) and weak — bull ($\eta = 0,254$). There is a negative correlation between content of MDH2 isoforms and survival of sperm: human, boar and bull, respectively, $\eta = 0,559$; 0,846 and 0,555. MDH3 shows a strong positive correlation with the survival of sex cells in the boar ($\eta = 0,785$) and average force in bull ($\eta = 0,639$) ejaculates. Strong positive correlation between the activity of enzymes and their isoforms and spermatozoa survival indicates the need for the use of studied biochemical parameters to evaluate the physiological quality and insemination forecasting ability of germ cells.

Key words: ASPARTATE
DEHYDROGENASE, MALATE
DEHYDROGENASE, ISOFORM,
SPERMATOZOA SURVIVAL,
CORRELATION RATIO

СВЯЗИ МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ И СОДЕРЖАНИЕМ ИЗОФОРМ ЕНЗИМОВ МАЛАТ-АСПАРАТАТНОГО ШУНТА В ЭЯКУЛЯТАХ И ВЫЖИВАНИЕМ СПЕРМИЕВ

Н. В. Кузьмина
inenbiol@mail.lviv.ua

Институт биологии животных НААН, ул. Стуса, 38, Львов 79034, Украина

Изучали корреляции между активностью и содержанием изоформ малатдегидрогеназы (МДГ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ) с выживанием спермиев мужчин, хряков и быков. Установлено, что активность МДГ и АСТ в эякулятах проявляет видовую специфичность и составляет: у мужчины, соответственно, $0,35 \pm 0,09$ и $70,0 \pm 5,10$, хряка — $0,27 \pm 0,09$ и $53,3 \pm 8,8$ и быка $28,0 \pm 5,03$ и $63,2 \pm 6,30$ нмоль/мин × мг протеина. Содержание МДГ1 изоформы проявляет слабую видовую специфичность (21,5–28,2%), МДГ2 — значительно более высокую (77,2 ± 5,77% у мужчины и 22,2–28,2% у хряка и быка), МДГ3

отсутствует у мужчины, а у хряка и быка почти одинаковая (50,3 и 49,8%). Содержание АСТ1 в эякулятах мужчины высокое (59,2 ± 10,10%) и более низкое на 7,5–7,6% у хряка и быка ($p > 0,05$) и, напротив, АСТ2 у вторых более высокое (48,3–48,4%) и ниже на 7,5–7,6% ($p > 0,05$) у мужчины. Установлена сильная позитивная связь активности МДГ с выживанием спермиев в эякулятах хряка ($\eta = 0,807$) и быка ($\eta = 0,745$) и средней силы у мужчины ($\eta = 0,559$). Для выживания спермиев по активности АСТ существует сильная позитивная корреляция в эякулятах мужчины ($\eta = 0,742$), средней силы — у быка ($\eta = 0,330$) и негативная средней силы — у хряка ($\eta = 0,532$).

Корреляционное отношение между содержанием АСТ1 изоформы и выживанием спермиев всех видов самцов позитивное: мужчины — $\eta = 0,657$, быка — $\eta = 0,639$ и хряка — $\eta = 0,769$, а для содержания АСТ2 — негативное, соответственно $\eta = 0,740$, $0,586$, $0,722$. Содержание МДГ1 изоформы проявляет сильную позитивную корреляцию с выживанием половых клеток спермы мужчины ($\eta = 0,843$), средней силы — хряка ($\eta = 0,688$) и слабую — быка ($\eta = 0,254$). Существует негативная связь между содержанием МДГ2 изоформы и выживанием спермиев мужчины, хряка и быка, соответственно, $\eta = 0,559$, $0,846$ и $0,555$. МДГ3 проявляет сильную позитивную корреляцию с выживанием половых клеток в эякулятах хряка ($\eta = 0,785$) и средней силы у быка ($\eta = 0,639$). Сильные позитивные корреляции между активностью энзимов, их изоформами и выживанием спермиев свидетельствует о необходимости использования изученных биохимических показателей для оценивания физиологического качества и прогнозирования оплодотворяющей способности половых клеток.

Ключевые слова:

АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗА, МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА, ИЗОФОРМЫ, ВЫЖИВАНИЕ СПЕРМИЕВ, КОРРЕЛЯЦИОННОЕ ОТНОШЕНИЕ

За аеробних умов статеві клітини отримують енергію аеробним гліколізом і диханням [1]. При цьому, для спермій, як і для інших клітин організму, характерні ланки постачання та використання субстратів у циклі трикарбонових кислот (ЦТК), транспорту електронів і протонів у ланцюгу дихання мітохондрій [2]. Відомо, що основним шляхом надходження субстратів і відновних еквівалентів у мітохондрії статевих клітин є малат-аспартатний шунт, який представлений цитозольними та мітохондріальними ізоформами ензимів — малатдегідрогенази (МДГ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) [3, 4]. Цитозольна АСТ трансамінує аспартат з α -кетоглутаратом з утворенням глутамату та оксалоацетату, останній відновлюється цитозольною МДГ за участі НАДН до малату, який постачається в

мітохондрії та окиснюється мітохондріальною МДГ до оксалоацетату. Своєю чергою, оксалоацетат може включатися в ЦТК чи перетворюватися мітохондріальною АСТ в аспартат і транспортуватися в цитозоль. Незважаючи на чисельні дослідження активності вказаних ензимів у спермі та її компонентах різних видів самців [5–8], механізми регуляції метаболізму та забезпечення високих фізіологічних характеристик і, відповідно, запліднювальної здатності статевих клітин за участі АСТ та МДГ, а також роль в цих процесах окремих їх ізоформ не встановлені. Невідомими залишаються і видові особливості функціонування малат-аспартатного шунта в сперміях. У зв'язку з цим досліджували зв'язки між активностями АСТ, МДГ, вмістом їх ізоформ та виживанням статевих клітин в еякулятах.

Матеріали і методи

Досліджували свіжоотримані еякуляти чоловіків ($n = 45$), кнурів ($n = 18$) та бугаїв ($n = 60$). Сперму бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень, через дві доби; кнурів — мануальним методом, з режимом використання одна садка два рази на тиждень. Сперма чоловіків надана ДУ «Інститутом спадкової патології НАМН України» (Львів). Активність ензимів малат-аспартатного шунта (нмоль/хв \times мг протеїну) вивчали: МДГ — за швидкістю окиснення НАДН [9], а АСТ — методом Reitmann S. [10]. Ізоформи ензимів виявляли після електрофорезу в 7,5 % ПААГ методами — МДГ [11] і АСТ [12]. У свіжоотриманій спермі визначали концентрацію протеїну з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу [13] та виживання спермій при температурі 2–4 °С до припинення прямолінійно-поступального руху. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методами варіаційної статистики з використанням t-

критерію Стьюдента та η — кореляційного відношення [14]. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Результати й обговорення

Сперма характеризується неоднозначними величинами активності ензимів малат-аспартатного шунта, значення яких низькі у спермі кнура, відповідно, МДГ — $0,27 \pm 0,09$ і АСТ — $53,3 \pm 8,8$ нмоль/хв×мг протеїну, вищі на 11,5 і 18,5 % у бугая та найвищі ($0,35 \pm 0,09$ і $70,0 \pm 5,10$ нмоль/хв×мг протеїну) у чоловіка (табл. 1). Тобто, спермі чоловіка мають вищу здатність постачати амінокислоти в

ЦТК та генерувати відновні еквіваленти (НАДН) у мітохондріях, порівняно зі статевими клітинами бугая та кнура.

Виявлено, що еякуляти відрізняються не тільки за активністю ензимів малат-аспартатного шунта, але й за вмістом окремих ізоформ у загальному спектрі активних протеїнів ензимів. При цьому, вміст МДГ1 слабо залежить від виду самців, величина значення знаходиться в межах 21,5–28,2 %. Вищу видову відмінність встановлено при аналізі вмісту МДГ2 і МДГ3. Так, у спермі чоловіка вміст МДГ2 максимальний ($77,2 \pm 5,77$ %), а МДГ3 відсутня, в еякулятах кнура і бугая МДГ2 в межах 22,2–28,2 %, що нижче ніж у чоловіка на 49,0–55,0 % ($p < 0,001$), а МДГ3 — майже однаковий (50,3 і 49,8 %).

Таблиця 1

Активність та вміст ізоформ ензимів малат-аспартатного шунта у спермі самців

Фермент та його ізоформи	чоловік		кнур		бугай	
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
<i>МДГ</i>						
Активність, нмоль/хв×мг протеїну	40	$0,35 \pm 0,09$	18	$0,27 \pm 0,09$	55	$0,31 \pm 0,07$
Вміст ізоформ, %:						
МДГ1	33	$22,8 \pm 5,77$	16	$21,5 \pm 3,90$	31	$28,0 \pm 5,03$
МДГ2	16	$77,2 \pm 5,77^{***}$	33	$28,2 \pm 9,04$	31	$22,2 \pm 6,23$
МДГ3	-	-	16	$50,3 \pm 4,80$	31	$49,8 \pm 6,77$
<i>АСТ</i>						
Активність АСТ, нмоль/хв×мг протеїну	45	$70,0 \pm 5,10$	18	$53,3 \pm 8,80$	58	$63,2 \pm 6,30$
Вміст ізоформ, %:						
АСТ1	33	$59,2 \pm 10,10^*$	16	$51,6 \pm 9,00$	42	$51,7 \pm 14,30$
АСТ2	33	$40,8 \pm 10,10$	16	$48,4 \pm 9,00^*$	42	$48,3 \pm 14,30^*$

Примітка: в цій та інших таблицях різниця статистично вірогідна порівняно до мінімальної величини значення: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$

Аналіз вмісту ізоформ АСТ свідчить про вищу величину значення АСТ1 в еякулятах чоловіка ($59,2 \pm 10,10$ %) і нижчу на 7,5–7,6 % у кнура та бугая ($p > 0,05$) і, навпаки, у других — вищий вміст АСТ2 ($48,3$ – $48,4$ %) і нижчий на 7,5–7,6 % ($p > 0,05$) у чоловіка.

Вивченням залежності виживання спермій від активності ензимів малат-аспартатного шунта в еякулятах виявлено неоднозначну кореляцію як за напрямком, так і силою. Так, до $50,0$ нмоль/хв×мг

протеїну АСТ величина фізіологічного показника у спермі чоловіка і бугая становила, відповідно, $51 \pm 6,6$ і $93 \pm 13,3$ год, а у кнура — $148 \pm 12,1$ год (табл. 2). Підвищення до $70,0$ нмоль/хв×мг протеїну АСТ характеризує вище на 25 год ($32,9$ %; $p < 0,05$) виживання спермій чоловіка і на 21 год ($18,5$ %) бугая та нижче на 46 год ($31,1$ %; $p < 0,05$) кнура. За активності більше $70,0$ нмоль/хв×мг протеїну у чоловіка і бугая виживання спермій однаково високе (121 год), а у кнура —

найнижче ($96 \pm 1,9$ год). Різниця між мінімальними та максимальними величинами виживання спермійів чоловіка — $67,9\%$ ($p < 0,001$), бугая — $23,2\%$ і кнура — $35,2\%$ ($p < 0,01$). Кореляційне відношення за активністю АСТ для виживання спермійів чоловіка і бугая позитивне (відповідно, $\eta = 0,742$ і $\eta = 0,330$), а кнура — негативне ($\eta = 0,532$). Отже, у спермі (сперміях) чоловіка і бугая

за підвищення активності АСТ зростають процеси переамінування, що забезпечує збільшення часу виживання, а у кнура, навпаки, зниження. Встановлена сильна позитивна кореляція між активністю АСТ і виживанням спермійів чоловіка свідчить про придатність вказаного ензиму для оцінювання фізіологічної якості і прогнозування запліднюючої здатності статевих клітин.

Таблиця 2

Вживання спермійів у зв'язку з активністю та вмістом ізоформ АСТ в еякулятах

Еякуляти	Активність АСТ, нмоль/хв×мг протеїну						η
	50,0 <		50,0–70,0		> 70,0		
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	
	<i>Вживання спермійів, год</i>						
чоловіка	8	51±6,6	11	76±7,4	15	121±8,9***	0,742
кнура	5	148±12,1**	7	102±9,1	3	96±1,9	0,532
бугая	7	93±13,3	23	114±4,6	18	121±7,0	0,330
	<i>Вміст АСТ1-ізоформи, %</i>						
	30,0 <		30,0–60,0		> 60,0		
чоловіка	5	66±7,5	12	98±10,9*	15	136±10,8***	0,657
кнура	8	90±7,0	3	120±11,3*	4	168±10,7***	0,769
бугая	4	54±13,0	25	115±5,1***	9	130±4,5***	0,639
	<i>Вміст АСТ2-ізоформи, %</i>						
	30,0 <		30,0–60,0		> 60,0		
чоловіка	12	125±9,0***	12	74±7,1	8	60±8,4	0,740
кнура	6	148±12,0***	3	128±6,5***	6	80±4,6	0,722
бугая	4	132±3,0***	25	118±5,1***	9	73±11,0	0,586

Аналізом кореляцій між вмістом ізоформ АСТ та виживанням статевих клітин встановлено до 30,0 % АСТ1 низьку величину значення фізіологічного показника в еякулятах: чоловіка — $66 \pm 7,5$ год, кнура — $90 \pm 7,0$ год і бугая — $54 \pm 13,0$ год. Підвищення до 60,0 % АСТ1 збільшує на 32 год ($32,7\%$; $p < 0,05$) виживання спермійів чоловіка, на 30 год ($25,0\%$; $p < 0,05$) кнура і на 61 год ($53,1\%$; $p < 0,001$) бугая, яке при більше 60,0 % ізоформи найвище, відповідно, $136 \pm 10,8$, $168 \pm 10,7$ і $130 \pm 4,5$ год. Кореляційне відношення за вмістом АСТ1 для виживання спермійів позитивне у спермі чоловіка ($\eta = 0,657$), бугая ($\eta = 0,639$) і кнура ($\eta = 0,769$).

Підвищення вмісту АСТ2 в еякулятах знижує виживання спермійів. Зокрема, до 30 % ізоформи величина фізіологічного показника висока:

$125 \pm 9,0$ год у чоловіка, $148 \pm 12,0$ год у кнура і $132 \pm 3,0$ год у бугая. При збільшенні до 60,0 % АСТ2 виживання знижується на 51 год ($40,8\%$; $p < 0,001$) у чоловіка, на 20 год ($13,6\%$) у кнура і на 14 год ($10,7\%$; $p < 0,05$) у бугая, яке при більше 60,0 % ізоформи ще менше, відповідно, на 14 год ($19,0\%$), 48 год ($37,5\%$; $p < 0,001$) і 45 год ($38,2\%$; $p < 0,001$) та становить — $60 \pm 8,4$, $80 \pm 4,6$ і $73 \pm 11,0$ год. Кореляційне відношення за вмістом АСТ2 для виживання спермійів негативне у спермі чоловіка ($\eta = 0,740$), кнура ($\eta = 0,722$) і бугая ($\eta = 0,586$).

Оскільки встановлено [15], що ізоформи АСТ1 сперми чоловіка і бугая та АСТ2 — кнура цитоплазматичного, а АСТ1 — кнура і АСТ2 — чоловіка і бугая мітохондріального походження, з результатів досліджень випливає, що підвищення вмісту цитозольної ізоформи

(АСТ1) у статевих клітинах чоловіка і бугая збільшує їх виживання, а у кнура (АСТ2) — знижує ($\eta = 0,722$). При цьому, підвищення вмісту мітохондріальної ізоформи (АСТ2) спермійв чоловіка і бугая знижує їх виживання (відповідно, $\eta = 0,740$ і $0,586$), а у кнура (АСТ1), навпаки, підвищує ($\eta = 0,769$). Встановлені залежності свідчать про доцільність використання ізоформ АСТ, як біохімічних маркерів, для оцінювання якості і запліднювальної здатності спермійв.

Вивченням зв'язку між активністю МДГ та виживанням спермійв встановлено до $0,20$ нмоль/хв \times мг протеїну майже однакову величину фізіологічного показника: $70\pm 7,1$ год у чоловіка, $85\pm 6,6$ год — кнура і $82\pm 7,7$ год — бугая (табл. 3). За підвищення до $0,30$ нмоль/хв \times мг протеїну МДГ виживання зростає на $30,8$ год ($35,2\%$; $p < 0,01$) у чоловіка, на 43 год ($33,6\%$; $p < 0,001$) у кнура і на 20 год ($26,8\%$; $p < 0,05$) у бугая та за активності більше $0,30$ нмоль/хв \times мг протеїну — найвище, відповідно, $120\pm 10,8$, $168\pm 2,0$ та $140\pm 4,7$ год. Кореляційне відношення за активністю МДГ для виживання спермійв чоловіка ($\eta = 0,559$), кнура ($\eta = 0,807$) і бугая ($\eta = 0,745$) позитивне. Отже, сильна позитивна залежність виживання спермійв від активності МДГ свідчить про доцільність використання вказаного ензиму для оцінювання фізіологічних якостей спермійв в еякулятах кнура і бугая.

Вивченням кореляцій між вмістом ізоформ ензиму та виживанням спермійв в еякулятах чоловіка встановлено до $20,0\%$ МДГ1 низьку величину фізіологічного показника ($74\pm 5,5$ год), за підвищення до $30,0\%$ вона на 70 год ($48,7\%$; $p < 0,001$) зростає, а при більше $30,0\%$ ізоформи не змінюється і становить $144\pm 7,4$ год. В еякулятах кнурів до $20,0\%$ МДГ1 виживання $84\pm 6,0$ год, при збільшенні до $30,0\%$ величина значення зростає на 16 год ($16,0\%$) і при більше $30,0\%$ становить $152\pm 6,6$ год, що вище на 52 год ($34,3\%$; $p < 0,01$) попереднього та на 68 год ($44,8\%$; $p < 0,001$) від вихідного значень.

В еякулятах бугаїв від вмісту МДГ1 виживання спермійв залежить слабо, величина значень у класах варіаційного ряду — 106 – 118 год, різниця 12 год ($10,2\%$) знаходиться в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом МДГ1 для виживання спермійв чоловіка ($\eta = 0,814$), кнура ($\eta = 0,688$) і бугая ($\eta = 0,159$) позитивне. Вміст МДГ2 проявляє негативну залежність з виживанням спермійв. Так, до $20,0\%$ ізоформи у спермі кнура та бугая і до $75,0\%$ — у чоловіка, виживання високе, відповідно, $176\pm 26,1$, $126\pm 5,6$ і $128\pm 8,4$ год. При збільшенні МДГ2 до $30,0\%$ у спермі кнура та бугая і до $85,0\%$ — чоловіка величина значення знижується, відповідно, на 47 год ($26,8\%$), 25 год ($19,9\%$; $p < 0,05$) і 20 год ($15,7\%$; $p < 0,05$). За вмісту МДГ2 більше $30,0\%$ у кнура та бугая і більше $85,0\%$ — чоловіка виживання спермійв ще менше, відповідно, на 47 год ($36,5\%$; $p < 0,001$), 30 год ($29,8\%$) і 45 год ($41,7\%$; $p < 0,01$) та нижче на 94 год ($53,5\%$; $p < 0,01$), 55 год ($43,7\%$; $p < 0,01$) і 65 год ($50,8\%$; $p < 0,001$) вихідних значень. Кореляційне відношення за вмістом МДГ2 для виживання спермійв кнура ($\eta = 0,846$), чоловіка ($\eta = 0,555$) і бугая ($\eta = 0,559$) негативне.

Вміст МДГ3 проявляє позитивну залежність з виживанням спермійв. У спермі кнура і бугая до $40,0\%$ ізоформи величина показника майже однакова, відповідно, $84\pm 4,9$ і $89\pm 7,0$ год. Підвищення до $50,0\%$ МДГ3 збільшує виживання спермійв на 31 год ($27,0\%$; $p < 0,05$) кнура і на 16 год ($15,3\%$) бугая, яке при більше $50,0\%$ ізоформи ще зростає, відповідно, на 53 год ($31,6\%$; $p < 0,01$) і на 30 год ($22,3\%$; $p < 0,01$). Кореляційне відношення за вмістом МДГ3 для виживання спермійв кнура ($\eta = 0,785$) і бугая ($\eta = 0,639$) позитивне. Оскільки ізоформи МДГ2 в еякулятах чоловіка, МДГ2 і МДГ3 бугая та МДГ3 кнура виявляються в цитоплазмі, а МДГ1 — у всіх досліджених видів самців та МДГ2 кнура — у мітохондріях спермійв [16], можна стверджувати, що зростаючий вміст мітохондріальної ізоформи (МДГ1)

зумовлює підвищення виживання спермій чоловіка ($\eta = 0,814$) і кнура ($\eta = 0,688$), а у бугая — не змінює ($\eta = 0,159$). У сперміях кнура зростання другої (МДГ2) мітохондріальної ізоформи ферменту знижує тривалість існування статевих клітин ($\eta = 0,846$). Збільшення вмісту першої цитозольної ізоформи (МДГ2)

характеризує зниження виживання спермій чоловіка і бугая (відповідно, $\eta = 0,555$ і $0,559$). При цьому, збільшення вмісту другої цитозольної ізоформи (МДГ3) призводить до підвищення виживання спермій (у кнура — $\eta = 0,785$ і бугая — $\eta = 0,639$).

Таблиця 3

Виживання спермій у зв'язку з активністю та вмістом ізоформ МДГ в еякулятах

Еякуляти	Активність МДГ, нмоль/хв×мг протеїну						η
	0,20 <		0,20–0,30		> 0,30		
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	
	<i>Виживання спермій, год</i>						
чоловіка	15	70±7,1	10	108±8,3**	7	120±10,8***	0,559
кнура	4	85±6,6	7	128±6,5***	3	168±2,0***	0,807
бугая	14	82±7,7	17	112±4,2*	13	140±4,7***	0,745
	<i>Вміст МДГ1-ізоформи, %</i>						
	20,0 <		20,0–30,0		> 30,0		
чоловіка	19	74±5,5	4	144±12,0***	8	144±7,4***	0,814
кнура	4	84±6,0	6	100±11,5	5	152±6,6***	0,688
бугая	4	106±18,2	12	118±11,7	15	107±5,7	0,159
	<i>Вміст МДГ2-ізоформи, %</i>						
	20,0 <		20,0–30,0		> 30,0		
кнура	3	176±26,1**	5	129±5,2***	7	82±4,5	0,846
бугая	14	126±5,6**	13	101±7,5	4	71±14,3	0,555
	75,0 <		75,0–85,0		> 85,0		
чоловіка	14	128±8,4***	10	108±10,0**	7	63±5,5	0,559
	<i>Вміст МДГ3-ізоформи, %</i>						
	40,0 <		40,0–50,0		> 50,0		
кнура	6	84±4,9	5	115±10,2*	4	168±10,8**	0,785
бугая	4	89±7,0	18	105±8,4	9	135±5,5**	0,639
чоловіка	-	-	-	-	-	-	-

Отже, виявлена локалізація ензимів і їх ізоформ та вплив на виживання спермій свідчить, що за аеробних умов активування МДГ, збільшення вмісту її домінуючої мітохондріальної ізоформи зумовлює постачання субстратів у ЦТК, що забезпечує ресинтез АТФ для забезпечення тривалого прямолінійно-поступального руху статевих клітин. Це зумовлено тим, що мітохондріальна ізоформа МДГ (МДГ1) в сперміях є структурним компонентом ЦТК та здійснює окиснення малату до оксалоацетату і відновлення НАД⁺, а оксалоацетат з'єднується з новою молекулою ацетил-КоА і починає новий оберт циклу. Тим самим, у ланцюг дихання мітохондрій постачаються електрони й

протони та забезпечуються ресинтез АТФ і високе виживання спермій. Друга мітохондріальна МДГ (МДГ2) у кнура, ймовірно, є неактивною ізоформою, яка під час активування ЦТК перетворюється в МДГ1.

Напрямок процесу в спермі чоловіка та бугая підтверджує низька активність мітохондріальної АСТ (АСТ2), яка здійснює трансамінування глутамату з оксалоацетатом, зумовлюючи відтік з мітохондрій субстратів ЦТК — α -кетоглутарату. Водночас, активування АСТ і збільшення виживання спермій спричиняє підвищення цитозольної АСТ (АСТ1), яка здійснює трансамінування аспартату з α -кетоглутаратом і постачання

глутамату в мітохондрії, який у процесі окисного дезамінування може перетворюватись в α -кетоглутарат і використовуватись в ЦТК.

На протигагу, в сперміях кнура, за підвищення їх виживання, низький вміст цитозольної АСТ (АСТ2) характеризує менший відтік α -кетоглутарату та аспартату з мітохондрій, а збільшення вмісту мітохондріальної ізоформи АСТ (АСТ1), яке супроводжується зниженням активності АСТ, зумовлює інтенсивне використання в ЦТК субстратів окиснення (α -кетоглутарату) і збільшує час існування статевих клітин.

Високий вміст цитозольної МДГ (МДГ2) у сперміях чоловіка і, відповідно, перетворення оксалоацетату в малат, може вказувати на інтенсивне окиснення (використання) субстратів. Внаслідок, швидкого вичерпання субстратів сперми і, як наслідок, їх дефіциту, знижується ресинтез АТФ, що проявляється зменшенням часу виживання спермій. В еякулятах кнура та бугая, інтенсивне використання субстратів у ЦТК, зумовлює підвищення вмісту цитозольної МДГ (МДГ3) і, відповідно, відновлення оксалоацетату до малату в цитозолі і транспорт останнього в мітохондрії, що забезпечує збільшення часу виживання статевих клітин. Зниження вмісту першої цитозольної ізоформи МДГ (МДГ2) у бугая, при підвищенні виживання спермій, а також обернений зв'язок з активністю ензиму [16], свідчить, що в процесі виживання спермій змінюється конформаційна будова ізоформи і вона переходить в активний стан — в МДГ3.

Таким чином, ефективне функціонування ЦТК, ресинтез АТФ і, відповідно, збільшення виживання статевих клітин забезпечується в сперміях чоловіка за рахунок надходження та ефективного використання глутамату, кнура — надходження малату та використання α -кетоглутарату, а бугая — надходження та використання глутамату і малату. Отже, встановлені в результаті досліджень кореляційні зв'язки між активністю,

вмістом ізоформ ензимів малат-аспартатного шунта та виживанням спермій свідчать про участь ензимів у забезпеченні енергією статевих клітин для існування, а досліджені біохімічні показники є критеріями їх фізіологічної якості.

Висновки

1. Існують видові відмінності активності ензимів малат-аспартатного шунта (нмоль/хв \times мг протеїну): у спермі кнура — низькі, відповідно, МДГ — $0,27 \pm 0,09$ і АСТ — $53,3 \pm 8,8$, вищі на 11,5 і 18,5 % — у бугая та найвищі ($0,35 \pm 0,09$ і $70,0 \pm 5,10$) у чоловіка.

2. Вміст ізоформ МДГ у спермі проявляє: МДГ1 — слабку видову залежність (21,5–28,2 %); МДГ2 найбільший ($77,2 \pm 5,77$ %) у чоловіка, а у кнура і бугая в межах 22,2–28,2 %; МДГ3 — у чоловіка відсутня, у кнура і бугая — майже однаковий (50,3 і 49,8 %).

3. Вміст АСТ1 в еякулятах чоловіка високий ($59,2 \pm 10,10$ %) і нижчий на 7,5–7,6 % у кнура та бугая ($p < 0,05$) і, навпаки, АСТ2 — у других вищий (48,3–48,4 %) і нижчий на 7,5–7,6 % ($p < 0,05$) у чоловіка.

4. Існує сильна позитивна кореляція між активністю АСТ і виживанням спермій в еякулятах чоловіка ($\eta = 0,742$) і середньої сили — в бугая ($\eta = 0,330$) та негативна — у кнура ($\eta = 0,532$).

5. Вміст АСТ1 позитивно корелює з виживанням спермій: у спермі чоловіка ($\eta = 0,657$), бугая ($\eta = 0,639$) і кнура ($\eta = 0,769$), а вміст АСТ2 — негативно, відповідно, $\eta = 0,740$, $0,586$ і $0,722$.

6. Сильний прямий зв'язок за активністю МДГ характерний для виживання спермій кнура ($\eta = 0,807$) та бугая ($\eta = 0,745$) і середньої сили — чоловіка ($\eta = 0,559$).

7. Вміст ізоформ МДГ неоднозначно корелює з виживанням спермій: МДГ1 проявляє сильний прямий зв'язок у спермі чоловіка ($\eta = 0,843$), середньої сили в кнура ($\eta = 0,688$) і слабкий в бугая ($\eta = 0,159$);

МДГ2 — обернену сильну кореляцію ($\eta = 0,846$) в кнура і середньої сили ($\eta = 0,559$ і $0,555$) в чоловіка і бугая; МДГ3 позитивно корелює з виживанням статевих клітин у спермі кнура ($\eta = 0,785$) та бугая ($\eta = 0,639$).

Перспективи подальших досліджень. Для об'єктивного оцінювання якості еякулятів за активністю ензимів малат-аспартатного шунта та їх ізоформ доцільно продовжити дослідження і вивчити залежність вказаних біохімічних показників від величини виживання спермій.

1. Shergin N. P. Biohimiya spermatozoidov selskohozyaystvennyih zhivotnyih [Biochemistry of spermatozoa of agricultural animals]. Moscow, Ear, 1967. 239 p. (In Russian).

2. Yablonskiy V. A., Homin S. P., ZavIryuha V. I. BiotehnologIchnI i molekulyarno-genetichni osnovi vidtvorenniya tvarin [Biotechnological and molecular-genetic bases of recreation of animals]. Lviv, TzOV VF AfIsha, 2009. 218 p. (In Russian).

3. Burgos C. Coronel C. E., de Burgos N. M., Rovai L. E., Blanco A. Studies in vitro on shuttle systems of mouse spermatozoa. Shuttle. *Biochem. J.*, 1982, vol. 208, no. 2, p. 413–417.

4. Calvin J. Tubbs P.K. Mitochondrial transport processes and oxidation of NADH by hypotonically-treated boar spermatozoa. *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 89, no. 1, p. 315–320.

5. Cordoba M., Pintos L., Beconi M. T. Differential activities of malate and isocitrate NAD(P)-dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*, 2005, vol. 37, no. 1, p. 40–46.

6. Tzvetkov D., Martinova J., Usunova J., Dimitrov S. Electron microscopic and enzyme investigations of the testicular tissue in infertile males. *Int. Urol. Nephrol.*, 1986, vol. 18, no. 3, p. 315–320.

7. Ibrahim M. A. R. Bulls seminal plasma enzyme activities as indicators of spermatozoa

motility, fertility and freezability. *Acta Veter. Acad. Scient. Hung.*, 1982, vol. 30, p. 227–233.

8. Nadroo G. A., Saxena V. B., Tripathi S. S. Studies on transaminases and phosphatases in semen plasma of Jersey and crossbred bulls. *Indian. Veter. J.*, 1987, vol. 64, p. 1053–1056.

9. Kochetov G. A. Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii [Practical guidance on enzymology]. Moscow, Higher school, 1980. 380 p. (In Russian).

10. Reitmann S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic puruvic transaminases. *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, vol. 28, no. 1, p. 56–63.

11. Garbus J. Serum malate dehydrogenase isoenzymes as indicators of severe cellular injury. *Clin. Chim. Acta*, 1971, vol. 35, p. 502–504.

12. Alfano J., Kahn M. Isolation and characterization of a gene coding for a novel aspartate aminotransferase from rhizobium meliloti. *Journal of Bacteriology*, 1993, vol. 175, p. 4186–4196.

13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 1951, vol. 193, no. 1, p. 264–275.

14. Plohinskiy N. A. Biometriya [Biometry]. Moscow, MSU, 1970. P. 53–60 (In Russian).

15. Kuzmina N. V., Ostapiv D. D., Yaremchuk I. M., Guleyuk N. L., Gumenetskiy I. E. Aktivnist ta vmist Izoform aspartataminotransferazy v eyakulyatah samtsiv i vizhivannya spermijiv [Activity and content of isoforms of aspartate aminotransferase in male ejaculates and spermatozoa survival]. *Biologiya tvarin — The Animals Biology*, 2012, vol. 14, p. 138–144 (in Ukrainian).

16. Kuzmina N. V. Aktivnist ta vmist izoform malatdegidrogenazi i vizhivannya spermijiv u eyakulyatah samtsiv [Activity and content of isoforms of malatedehydrogenase and survival of spermatozoa in male ejaculates]. *Biologiya ta valeologiya — Biology and valueology*, 2011, vol. 13, pp. 30–38 (in Ukrainian).