

УДК 616:36. 4. 08231. 453

Поліщук С.А., аспірант
Білоцерківський національний аграрний університет**ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ СПЕРМИ
КНУРІВ-ПЛІДНИКІВ**

У роботі наведені дані щодо дослідження окиснювальної модифікації білків у плазмі сперми та спермоцитоплазмі чистопородних кнурів-плідників великої білої породи та синтетичної лінії SS23. Встановлено, що вміст продуктів окислювальної модифікації білків плазмі сперми вищий порівняно із внутрішньоклітинним рівнем.

Ключові слова: кнурі-плідники, сперма, спермоцитоплазма, окиснювальна модифікація білків.

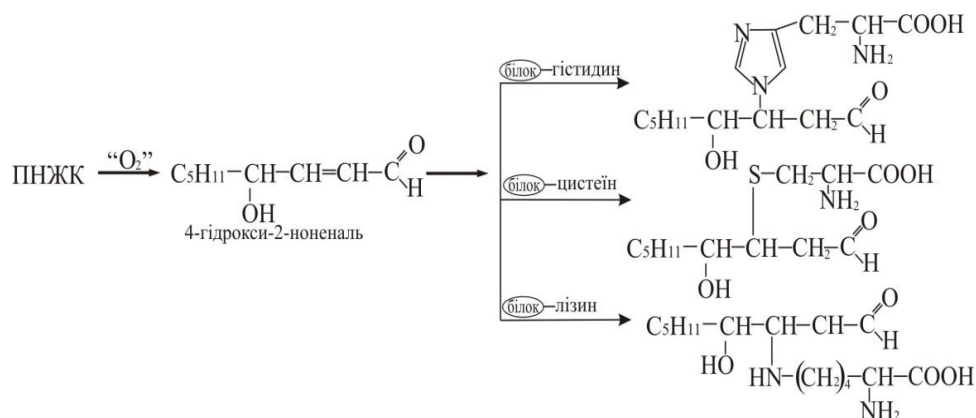
Нині накопичено значну кількість експериментальних даних щодо дії активних форм Оксигену (АФО) на природні біополімери [3, 6]. Інтенсивність вільнорадикальних процесів, функціонування системи антиоксидантного захисту в першу чергу залежать від характеру метаболічних процесів у органах і тканинах та впливу різних факторів навколишнього середовища. АФО можуть реагувати з різними органічними сполуками, такими як вуглеводи, нуклеїнові кислоти, ліпіди та білки. Так, наприклад, продукти взаємодії АФО із ліпідами інактивують більшість ферментів, шляхом окиснення функціональних груп (HS-, NH₂-, CH₃-) амінокислотних залишків, утворюють стабільні комплекси з білками та ініціюють полімеризацію білкових молекул, що сприяє руйнуванню клітинних структур. Продукти окиснення ліпідів (малоновий діальдегід, 4-гідрокси-2-ноненаль та 4-оксо-2-ноненаль) активно реагують з NH₂-групами залишків лізину, утворюючи поперечні зшивки у молекулах білка [5].

Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюгу, руйнуючи всі рівні їх структурної організації, що зумовлює до агрегації чи фрагментації молекули протеїнів. Агрегація білків пов'язана із властивістю АФО утворювати міжмолекулярні зшивки. У результаті денатурації білків порушується їх конформація, і вони стають більш чутливими до дії протеолітичних ферментів. Найбільш чутливими до окиснення є лізин, аргінін, пролін, треонін, сульфурумісні (метіонін, цистеїн, цистин) та ароматичні (гістидин, триптофан, тирозин) амінокислотні залишки білків, які перетворюються на карбонільні похідні [5, 7].

Таким чином, карбонілювання білків, часто використовується для кількісної, та якісної оцінки окиснювальної модифікації білків (ОМБ). Продукти ОМБ мають триваліший період розпаду, порівняно із продуктами пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що робить їх перспективним маркером оцінки інтенсивності вільнорадикального окиснення у біологічних системах [6]. На сьогодні відомо декілька механізмів окисної модифікації білків.

Перший механізм ОМБ – кон'югація ліпідних пероксидів із амінокислотними залишками гістидину, цистеїну та лізину в білках (рис 1).

А)



Б)

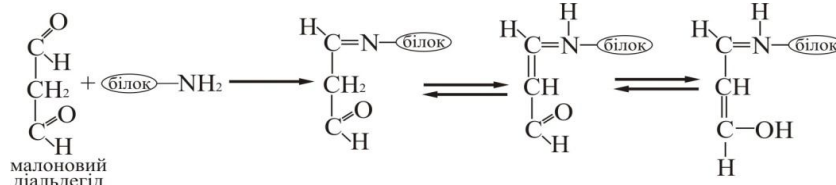


Рис. 1. Формування білкових карбонілів у результаті реакції із поліненасиченими жирними кислотами (А) та продуктами ПОЛ (Б).

Другий механізм – окиснення за участі АФО з утворенням карбонільних похідних, а також дисульфідів цис-S-S-цис, цистеїн-сульфенової (RSH), -сульфінової (RSO₂H) або сульфенової (RSO₃H) кислот, сульфоксиду метіоніну (MetSO) (рис 2) [5, 6].



Рис. 2. Продукти окиснювальної модифікації білка.

Останнім часом до ОМБ запропоновано відносити глікування та глікооксидацію лізинових та аспарагінових залишків (рис. 3)[5].

У якості основних індукторів окиснювальної модифікації білків, у першу чергу, розглядають АФО, збільшення вільних іонів Феруму, продукти ПОЛ за умов зниження активності ферментів антиоксидантного захисту. Карбонільні похідні білків – це стабільні продукти, які утворюються за участі амінокислотних залишків проліну, аргініну, лізину, треоніну із утворенням аддуктів Міхаеля (рис. 4) [5].

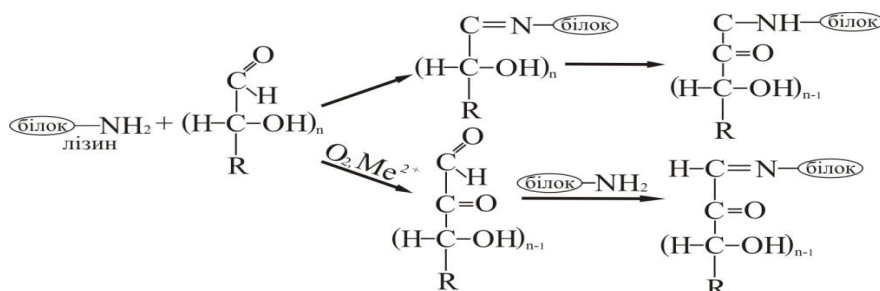


Рис. 3. Формування білкових карбонілів шляхом глікування та глікооксидації.

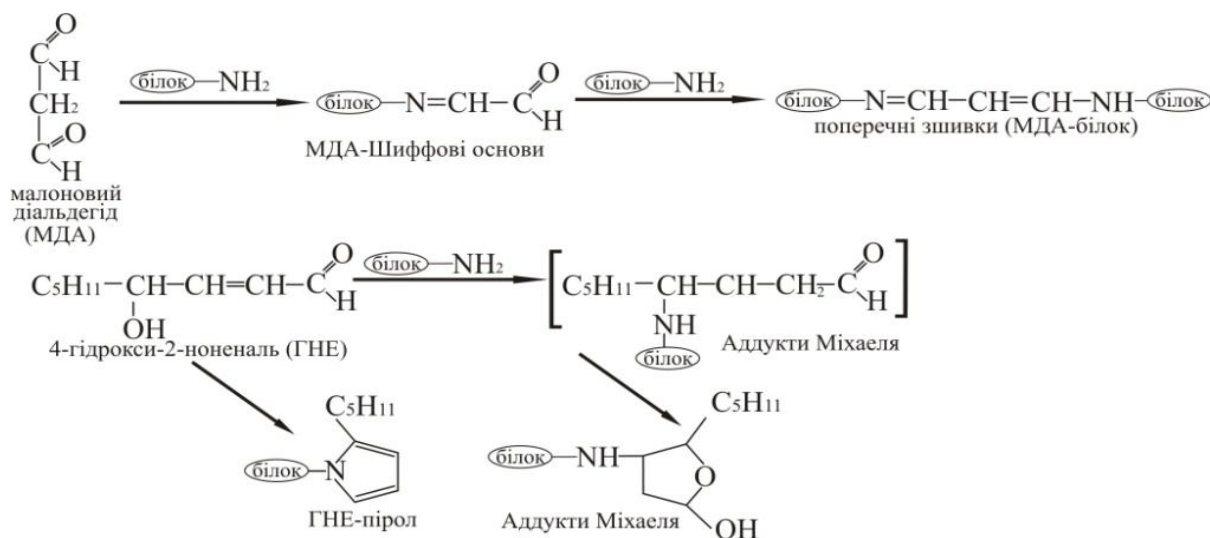


Рис. 4. Формування аддуктів Міхаеля.

Активні форми Оксигену суттєво впливають на перебіг процесів запліднення. Актуальним питанням сьогодення є вивчення ролі АФО у процесах формування та життєдіяльності спермій [4]. В еякуляті джерелом утворення АФО є спермії (за неправильної диференціації клітин у період стадій сперматогенезу) та лейкоцити. У фізіологічних умовах АФО необхідні для реакції капацитації, акросомальної реакції та запліднення.

Відомо, що будь-який негативний фактор, здійснює прямий чи опосередкований вплив на клітини сперми, сприяє синтезу АФО та окиснювальним пошкодженням спермій. Гіперпродукція АФО та зниження активності системи антиоксидантного захисту зумовлює розвиток окиснювального стресу, за якого проходить руйнування біоструктур клітини. Ці порушення асоціюються зі зниженням рухомості клітин, фрагментацією ДНК і, як наслідок, знижується відсоток запліднюваності тварин [3, 4].

Наведені дані свідчать про актуальність проблеми та доцільність проведення досліджень щодо вивчення особливостей інтенсивності окиснювальної модифікації білків у спермі кнурів-плідників.

Метою дослідження було встановити вміст продуктів окиснювальної модифікації білків у плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів-плідників, що є важливим маркером для оцінки функціонального стану статевих клітин.

Методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 16 кнурх НДГ ТОВ «Еліта». Матеріалом слугувала сперма, яку одержували мануальним способом від 8 чистопорідних кнурів великої білої породи та 8 кнурів синтетичної лінії SS23. Плазму сперми відділяли шляхом центрифугування (3000 об./хв. 10 хв.), а статеві клітини дворазово відмивали у фізіологічному розчині. Руйнування здійснювали за допомогою диференційного центрифугування з використанням швидкісної рефрижераторної центрифуги (14000 g/хв. протягом 10 хв.). Метод оцінки ОМБ ґрунтується на реакції взаємодії окиснених амінокислотних залишків білків із 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) із утворенням альдегід- та кетондинітрофенілгідрозонів нейтрального і основного характеру в плазмі сперми та спермоцитоплазмі (рис. 5) [2].

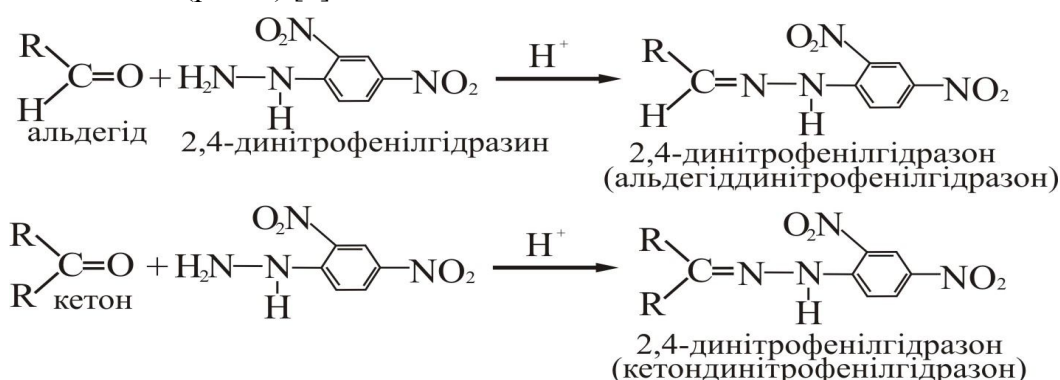


Рис. 5. Виявлення карбонільних сполук за реакцією із 2,4-динітрофенілгідразином.

Оптичну щільність карбонільних похідних динітрофенілгідрозонів, які утворилися, реєстрували за різної довжини хвилі: 356 нм – аліфатичні кетондинітрофенілгідрозони нейтрального характеру (КДНФГ НХ); 370 нм – аліфатичні альдегіддинітрофенілгідрозони (АДНФГ НХ); 430 нм – аліфатичні КДНФГ основного характеру; 530 нм – аліфатичні АДНФГ основного характеру (АДНФГ ОХ). Результати дослідження обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента, та з використанням пакету прикладних програм для обробки медичної та біологічної інформації Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США).

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень встановлено, що концентрація загального білка у плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів плідників була вищою (на 17,6 та 4,6% відповідно) порівняно із чистопорідними тваринами (рис. 6).

Основна кількість динітрофенілгідрозонів, які утворилися, належать до альдегід- та кетондинітрофенілгідрозонів нейтрального характеру. Вірогідної різниці між цими показниками в проведених дослідженнях не виявлено. Аналізуючи окиснювальну модифікацію білків плазми сперми та спермоцитоплазми статевих клітин кнурів виявлено, що вміст кетондинітрофенілгідрозонів основного та нейтрального характеру вищий (на 10,0%) у плазмі сперми чистопорідних кнурів. Натомість кількість КДНФГ ОХ та НХ у середині клітини плідників великої білої породи на 11,6 % нижче порівняно із вмістом цих продуктів у тварин лінії SS23. Дослідження АДНФГ основного та нейтрального характеру показало менший вміст цих продуктів окиснення, у плазмі та спермоцитоплазмі чистопорідних тварин.

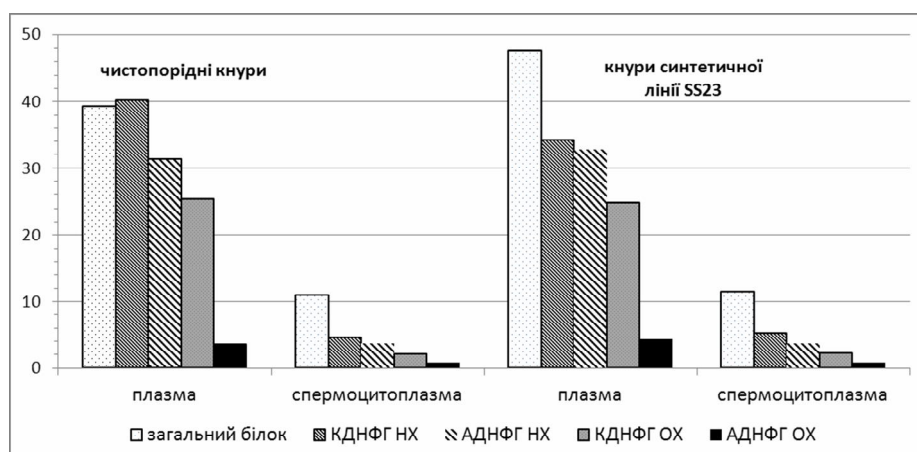


Рис. 6. Вміст загального білка та продуктів окиснювальної модифікації білків у плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів-плідників, ммоль/г білка ($M \pm m$; $n=8$).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили із використанням статистичного пакету (Statistica 6.0) та врахуванням параметричних та непараметричних даних (табл.1, 2).

Таблиця 1. Статистично оброблені показники альдегід- та кетодінітрофенілгідрозонів в плазмі та спермоцитоплазмі кнурів-плідників великої білої породи

| Показник | Чистопорідні кнури-плідники великої білої породи | | | | | | | |
|----------------------------|--|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| | плазма | | | | спермоцитоплазма | | | |
| | $\lambda=356$ | $\lambda=370$ | $\lambda=370$ | $\lambda=530$ | $\lambda=356$ | $\lambda=370$ | $\lambda=370$ | $\lambda=530$ |
| Мін | 30,687 | 24,188 | 18,397 | 2,398 | 3,289 | 2,618 | 1,561 | 0,561 |
| Макс | 49,032 | 38,631 | 33,059 | 4,616 | 6,228 | 4,650 | 2,769 | 1,067 |
| Діапазон (розмах варіації) | 18,344 | 14,442 | 14,361 | 2,218 | 2,936 | 2,031 | 1,208 | 0,506 |
| Дисперсія | 47,785 | 23,624 | 26,036 | 0,596 | 1,534 | 0,587 | 0,176 | 0,027 |
| Середнє відхилення | 6,913 | 4,866 | 5,103 | 0,772 | 1,238 | 0,766 | 0,419 | 0,164 |
| Коефіцієнт варіації | 0,172 | 0,155 | 0,201 | 0,220 | 0,236 | 0,213 | 0,202 | 0,223 |
| Асиметрія | -0,144 | -0,097 | 0,452 | 0,226 | 0,285 | 0,232 | 0,619 | 1,036 |
| Екссес | 1,543 | 1,939 | 1,975 | 1,842 | 1,679 | 1,790 | 2,114 | 3,223 |
| Медіана | 40,796 | 32,444 | 24,264 | 3,276 | 4,323 | 3,514 | 1,993 | 0,698 |
| Критерій Шапіро-Уїлка | 0,935 | 0,964 | 0,925 | 0,936 | 0,931 | 0,926 | 0,913 | 0,888 |

Концентрація продуктів окиснювальної модифікації білків у плазмі сперми тварин обох груп значно вища проти показників спермоцитоплазми.

Внутрішньоклітинний рівень окиснених білків відображає баланс між інтенсивністю окиснення та швидкістю деградації окиснених білків. При цьому слід зауважити, що вміст карбонільних сполук у спермоцитоплазмі кнурів-плідників

синтетичної лінії вищий на 8,3 %. Це вказує на те, що внутрішньо клітинне окиснення білків проходить інтенсивніше у кнурів лінії SS23. Також такі зміни можна пов'язати із морфо-функціональними особливостями сперми плідників спеціалізованої лінії SS23. З іншого боку зростання концентрації продуктів ОМБ можна розглядати як компенсаторну реакцію організму, яка направлена на збільшення резерву системи антиоксидантного захисту (підвищення рівня глутамата, цистеїну). Також інтенсифікація ОМБ є однією із причин пригнічення ферментативного ланцюга системи антиоксидантного захисту організму.

Таблиця 2. Статистично оброблені показники альдегід- та кетодінітрофенілгідрозонів в плазмі та спермо цитоплазмі кнурів-плідників синтетичної лінії SS23

| Показник | Синтетична лінія SS23 | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| | плазма | | | | спермоцитоплазма | | | |
| | $\lambda=356$ | $\lambda=370$ | $\lambda=370$ | $\lambda=530$ | $\lambda=356$ | $\lambda=370$ | $\lambda=370$ | $\lambda=530$ |
| Мін | 26,986 | 26,556 | 19,231 | 3,221 | 4,520 | 3,076 | 1,417 | 0,609 |
| Макс | 44,241 | 42,288 | 31,529 | 5,837 | 6,316 | 4,641 | 2,762 | 0,879 |
| Діапазон (розмах варіації) | 17,254 | 15,731 | 12,298 | 2,616 | 1,796 | 1,565 | 1,345 | 0,269 |
| Дисперсія | 41,881 | 36,005 | 17,812 | 1,116 | 0,406 | 0,250 | 0,153 | 0,009 |
| Середнє відхилення | 6,471 | 6,000 | 4,220 | 1,056 | 0,637 | 0,50 | 0,391 | 0,095 |
| Коефіцієнт варіації | 0,189 | 0,183 | 0,171 | 0,246 | 0,121 | 0,135 | 0,180 | 0,129 |
| Асиметрія | 0,593 | 0,588 | 0,268 | 0,580 | 0,399 | 0,621 | -0,582 | 0,091 |
| Екссес | 1,963 | 1,902 | 1,944 | 1,791 | 1,906 | 2,567 | 3,160 | 1,696 |
| Медіана | 32,958 | 31,478 | 24,544 | 4,034 | 5,193 | 3,583 | 2,239 | 0,731 |
| Критерій Шапіро-Уїлка | 0,889 | 0,887 | 0,972 | 0,848 | 0,913 | 0,951 | 0,927 | 0,941 |

З даних обрахунків видно, що розмах варіації в спермі кнурів синтетичної лінії менший порівняно з діапазоном розділення показників у спермі плідників великої білої породи. Дисперсія та середнє відхилення значно вищі у плазмі сперми обох дослідних груп, що характеризує значне відхилення показників ряду розподілу від середнього арифметичного. Коефіцієнт варіації показників обох дослідних груп майже не відрізняється, що означає плавномірність показників досліджень.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено, що плазма сперми та спермоцитоплазма кнурів-плідників синтетичної лінії SS23 характеризується високим вмістом продуктів окиснювальної модифікації білків. Це, ймовірно, пов'язано з вищою концентрацією загального білка, що можливо, зумовлює інтенсивніше окиснювання протеїнів. Отже, накопичення окиснених білків можна розглядати як один із факторів регуляції синтезу та розпаду білків.

Література

1. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т.41.– С. 24–26.
 2. Мещишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен // Бук. мед. вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158.
 3. Турнаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К.Т. Турнаев // Биохимия. – 2002. – 67, № 3. – С. 339–352.
 4. Шостя А.М. Роль активних форм кисню в регуляції сперматогенезу та заплідненні ссавців / А.М. Шостя // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 14–22.
 5. Davies K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids / K.J.A. Davies, M.E. Delsignore, S.W. Lin // J. Biol. Chem. – 1987. –Vol. 262, № 20. – P. 9902–9907.
 6. Grimsrud P. A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P. A. Grimsrud // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. – 283, № 32. – P. 21837–21841.
 7. Levine, R.L. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage / R.L. Levine, B.S. Berlett, J. Moskowitz et all. // Mech. Ageing Dev. – 1999. – Vol. 107, –P. 323–332.
-

Summary

Oxidative modification protein of hogs sperm / Polischuk S.A.

The result of research of protein oxidative modification of hogs sperm plasma and spermocytosplasma by clean line and synthetic line SS23. Determined that the content of products of protein oxidative modification in sperm plasma compared with the higher intracellular level.

Keywords: hogs, semen, spermocytosplasma, oxidative modification of proteins.