

УДК 612.616.2+612.015.3

ЕОЗИН γ -ЧУТЛИВА АТР-азна АКТИВНІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЧОЛОВІКІВ ЯК БІОХІМІЧНИЙ ТЕСТ НА ОЛІГОЗООСПЕРМІЮ

Н. С. КОЧЕШКОВА, З. Д. ВОРОБЕЦЬ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Україна;
e-mail: contact@mail.lviv.ua

На препаратах сперматозоїдів чоловіків репродуктивного віку (27–44 роки) досліджували чутливу до інгібувальної дії еозину γ АТР-гідролазну активність у нормі та при олігозооспермії за оброблення клітинної суспензії детергентами. Розроблено методичні підходи до тестування так званої “загальної” та еозин γ -чутливої АТР-гідролазної активності у сперматозоїдах. Із використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії підібрано оптимальний детергент – сапонін – для пермеабілізації їхньої плазматичної мембрани. Сапонін ефективно перфорує мембрани сперматозоїдів, зменшуючи середній гідродинамічний діаметр їх від 10–15 мкм до 3–8 мкм (у разі оброблення клітинної суспензії 0,05%-м розчином сапоніну) і навіть до 2–3 мкм (у разі оброблення суспензії сперматозоїдів 0,5%-м розчином детергенту). Неспецифічний інгібітор АТР-гідролазних систем еозин γ ефективно знижує АТР-азну активність непермеабілізованих сперматозоїдів на 40%. Дія еозину залежить від складу інкубаційного середовища. Під час моделювання зовнішньоклітинних умов (оптимальна концентрація детергенту – 0,05%) еозин γ -чутлива АТР-гідролазна активність сперматозоїдів у нормі та при олігозооспермії збагачується в середньому на 220–240%. Під час проведення ферментативної реакції за моделювання внутрішньоклітинних умов (оптимальна концентрація сапоніну 0,5%) виявлено підвищення еозин γ -чутливої АТР-азної активності в нормі до 350–400%, а при олігозооспермії – лише в межах 130–150%. Цю особливість може бути використано як простий та доступний лабораторний тест на розвиток даної патології чоловічої репродуктивної системи. Еозин γ дозозалежно інгібує “латентну” АТР-азну активність у сперматозоїдах як у нормі, так і при досліджуваній патології. В обох випадках у разі лінеаризації кривих каталітичного титрування АТР-азної активності еозином γ в координатах Хілла виявлено двофазну залежність – високої та низької афінності (середні значення уявної константи інгібування $I_{0,5}$ становлять 0,1 та 0,3–0,4 мМ відповідно). При цьому як за норми, так і при олігозооспермії для високоафінної компоненти властивою є позитивна кооперативність, а для низькоафінної – негативна. Одержані дані мають теоретичне та практичне значення для подальшого з'ясування мембранних механізмів, задіяних у підтримці іонного гомеостазу у сперматозоїдах людини та його порушення за різноманітних патологічних станів, а також можуть слугувати теоретичною основою для вдосконалення лабораторних біохімічних методів, спрямованих на тестування такої патології, як олігозооспермія.

Ключові слова: сперматозоїди, олігозооспермія, АТР-азна активність, лазерно-кореляційна спектроскопія, сапонін, еозин γ .

На сьогодні проблема безпліддя стосується близько 60–80 млн. сімей в усьому світі [1, 2]. Останнім часом все більше уваги приділяється патологіям чоловічої репродуктивної системи, оскільки виявилось, що причиною бездітних шлюбів у 40–50% випадків є “чоловічий” фактор [3, 4]. За даними офіційної статистики кількість неплідних чоловіків в Україні сягає близько 1 млн. (майже 7% чоловіків репродуктивного віку) [5, 6].

Існує багато методів обстеження стану репродуктивного здоров'я. Тривалий час у бездіт-

них шлюбах досліджували в основному жінок, тому зараз постає питання адекватної оцінки та діагностики репродуктивної здатності чоловіків [4]. Для встановлення діагнозу проводять ультразвукове, гормональне обстеження чоловіків (тести на тестостерон, дигідротестостерон, фолікулостимулюючий, лютеїнізуючий гормони, пролактин), морфологічні та біохімічні дослідження еякуляту (визначення концентрацій макроелементів, фруктози, лимонної кислоти, білка акрозину, оксиду азоту та вивчення реакцій фруктолізу, активності

оксид азот-синтази, тестування гранулоцитів у спермі, ідентифікація антиспермальних антитіл тощо) [1, 7, 8].

У лабораторній діагностиці широко використовуються морфологічні дослідження еякуляту (метод спермограм) [1, 3, 4]. При цьому визначають загальний об'єм сперми (2–5 мл), її рН (7,2–7,8), час розрідження (до 60 хв), густину (60–120 млн/мл) та загальну кількість сперматозоїдів в еякуляті (120–600 млн.), вміст живих (більше 50%) та рухливих (більше 50%) сперматозоїдів, відсоток патологічних форм (менше 20%), а також наявність клітин сперматогенезу, еритроцитів, лейкоцитів, тестують процеси аглютинації та агрегації сперматозоїдів. Цей метод дає можливість оцінити якість сперми та виявити можливі причини безпліддя. Проте часто результатів зазначених аналізів недостатньо для встановлення точного діагнозу. Тому важливим є розроблення нових швидких, чутливих та простих методів діагностики захворювань чоловічої репродуктивної системи.

Серед патологій чоловічої репродуктивної системи досить поширеною є олігозооспермія – зниження кількості сперматозоїдів (менше 60 млн/мл еякуляту) [1, 3, 9, 10]. Внаслідок цього постає питання вивчення причин її виникнення, удосконалення діагностики, лікування та профілактики олігозооспермії.

Проводяться численні дослідження в галузі діагностики та лікування захворювань чоловічої репродуктивної системи, що ґрунтуються, як відзначалося вище, на використанні різноманітних біохімічних підходів, зокрема оцінювання рівня інтенсивності різних метаболічних процесів у сперматозоїдах як у нормі, так і в разі розвитку тих чи інших патологічних станів. Є підстави очікувати, що розробки у цій галузі дадуть можливість з'ясувати особливості функціонування сперматозоїдів і більш точно та оперативно встановлювати діагноз, проводити адекватне лікування.

Одним із показників нормального функціонування клітини є стан активності іон-транспортувальних систем, які підтримують іонний (кальцієвий, натрієвий, калієвий, протонний) гомеостаз клітин. У мембранах сперматозоїдів ідентифіковано різні системи активного (Mg^{2+} -АТФ-залежного) і пасивного транспортування іонів, зокрема Ca^{2+} [11–14]. Як відомо, біохімічним виявленням систем Mg^{2+} -АТФ-залежного активного транспортування катіонів є ферментативна активність мембранозв'язаних АТФ-гідролаз. За патології активність цих гідролаз у мембранах сперматозоїдів порушується. У разі такого експеримен-

тального об'єкту, як сперматозоїди, існує багато проблем із визначенням ферментативної активності та вивченням властивостей АТФ-азних систем [17, 18]. По-перше, вони мають дуже низьку абсолютну ферментативну активність (одиниці нмоль P_i /хв на 1 мг білка); по-друге, надійно не відома локалізація окремих АТФ-аз; по-третє, не відпрацьовано режим інкубації для визначення так званої “латентної” внутрішньоклітинної АТФ-азної активності (зазвичай визначається в умовах пермеабілізації клітинної мембрани із використанням у середовищі інкубації різних детергентів [19, 20]). Не виключено, що коректне порівняльне визначення АТФ-гідролазної активності в суспензії свіжих сперматозоїдів у нормі та при патології (олігозооспермії), може бути корисним для розроблення зручного біохімічного лабораторного тесту зазначеної патології. Втім дані щодо ідентифікації, властивостей та функціональної ролі АТФ-азної активності у сперматозоїдах людини при олігозооспермії є досить обмежені та суперечливі [15, 16].

У літературі є свідчення на користь того, що еозин Y, один з похідних флуоресцеїну (2', 4', 5', 7'-тетрабромфлуоресцеїн) [21], неспецифічно та оборотно гальмує Mg^{2+} -залежні АТФ-гідролазні системи різних типів [22, 23]. Так, для транспортної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТФ-ази плазматичної мембрани міоцитів матки значення уявної константи інгібування $I_{0,5}$ становить ~ 1 , а еритроцитів – 0,04 мкМ, тобто є досить афінним [24].

Метою нашої роботи було розробити нові підходи, спрямовані на порівняльне дослідження властивостей “латентної” Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролазної активності у сперматозоїдах чоловіків з використанням методів біохімічної мембранології, ензимології та лазерно-кореляційної спектроскопії, вивчити вплив детергентів в різних умовах інкубації на еозин Y-чутливу АТФ-азну активність у нормі та при олігозооспермії.

Матеріали і методи

Еякулят пацієнтів віком 27–44 років ($30,6 \pm 1,5$, $n = 87$), наданий Централізованою клініко-діагностичною лабораторією Інституту урології АМН України, за даними спермограм [1, 4] було поділено на дві групи – група 1 (норма) та група 2 (олігозооспермія).

Сперматозоїди чоловіків відмивали від плазми еякуляту 3-разовим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв у середовищі відмивання, яке містило (мМ): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (рН 7,4).

Вміст білка в мембранній фракції визначали методом Lowry [30] з використанням набору для визначення його концентрації, виробництва НВФ «Simko LTD».

Так звану “загальну” еозин Y-чутливу Mg^{2+} -залежну АТР-азну активність сперматозоїдів визначали в суспензії відмитих клітин, розведених до концентрації 0,5–1,5 мг білка/мл. За визначення активності АТР-гідролазних систем різної локалізації використовували зовнішньо- та внутрішньоклітинне інкубаційні середовища (ЗКС та ВКС відповідно). Склад ЗКС (мМ): 120 NaCl, 30 KCl, 5 $MgCl_2$, 5 $CaCl_2$, 3 АТР, 30 Hepes (pH 7,4). Склад ВКС (мМ): 30 NaCl, 120 KCl, 5 $MgCl_2$, 10 мкМ $CaCl_2$, 3 АТР, 30 Hepes (pH 7,4).

Для пермеабілізації мембран сперматозоїдів та тестування “латентної” активності транспортних АТР-аз використовували різні детергенти: тритон X-100 [26, 27] у діапазоні концентрацій 0,025–0,5%, дигітонін [24, 26] у концентраціях 0,05–1% та сапонін [28, 29] – 0,05–1%. Визначення АТР-гідролазної активності проводили при 37 °С у середовищі об’ємом 0,4 мл, час інкубації – 5 хв. Ферментативну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (100 мкл) суспензії сперматозоїдів, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл так званого “стоп”-розчину наступного складу: натрій оцтовокислий – 1,5 М, формальдегід – 3,7%, етанол – 14%, ТХО – 5%, рН 4,3 (при 8 °С).

У частині дослідів (під час визначення “загальної” Mg^{2+} -залежної АТР-азної активності) контролем на неферментативний гідроліз АТР слугувало ЗКС/ВКС, яке не містило суспензії сперматозоїдів. Контролем на кількість ендogenousного неорганічного фосфору P_i в клітинному препараті був водний розчин суспензії сперматозоїдів. Отже, питому “загальну” АТР-азну ферментативну активність розраховували за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності та за відсутності суспензії сперматозоїдів з урахуванням поправки на неферментативний гідроліз АТР та вміст ендogenousного P_i в суспензії клітин. При визначенні еозин Y-чутливої Mg^{2+} -залежної АТР-азної ферментативної активності контролем слугувало ЗКС/ВКС відповідно, яке містило аліквоту білка та еозин Y в концентрації 1 мМ (за цих умов спостерігалось повне інгібування АТР-азної активності). Питому еозин Y-чутливу Mg^{2+} -залежну АТР-азну активність розраховували за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації у присутності та за відсутності суспензії спер-

матозоїдів, з урахуванням еозин Y-нечутливої компоненти (неферментативний гідроліз АТР). Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betluch [30].

Для перевірки ефективності перфорації спермальних мембран проводили визначення ефективного гідродинамічного діаметра сперматозоїдів до та після оброблення суспензії клітин різними концентраціями детергенту в середовищі відмивання. Аналіз проводили на лазерно-кореляційному спектрофотометрі PCS 100 (виробництва Malvern Instrument Limited, UK).

При вивченні концентраційної залежності дії еозину Y на “загальну” ферментативну активність сперматозоїдів, значення уявних констант інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до емпіричного рівняння Хілла $\ln[A/(A_0 - A)] = -n_H \ln I_{0,5} + n_H \ln[I]$, де A_0 та A – питома ферментативна активність за відсутності (“нульова точка”) та у присутності в середовищі інкубації еозину Y в концентрації I відповідно [31]. За такими графіками типове значення коефіцієнта кореляції r становить 0,98–1,0.

Результати досліджень обробляли статистично з використанням t -критерія Стьюдента. Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням загальновідомих стандартних методів. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення на персональному комп’ютері IBM PC.

У роботі застосовували такі реактиви: АТР, Hepes, еозин Y, дигітонін, тритон X-100 («Sigma», США), сапонін («Merk KgaA», Німеччина), Tris-гідроксиметил-амінометан («Reanal», Угорщина). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

1. *Вплив оброблення детергентами суспензії сперматозоїдів на збагачення “латентної” АТР-азної активності в нормі та при олігозооспермії (за ензимологічними даними та лазерно-кореляційної спектроскопії).*

Для визначення “латентної” Mg^{2+} -залежної АТР-азної активності сперматозоїдів на першому етапі наших досліджень ми проводили вивчення впливу різних детергентів на об’єкт, що досліджувався. Попередні експерименти проводили у ЗКС. Роботи з неіонними детергентами дигітоніном та тритоном X-100 не дали однозначних результатів. При оптимальній концентрації тритону X-100 0,05%

АТР-азна активність у сперматозоїдах зростала лише до $167,1 \pm 50,6\%$ ($M \pm m$, $n = 5$); а при оптимальній концентрації дигітоніну $0,1\%$ – до $143,1 \pm 26,6\%$ ($M \pm m$, $n = 5$). Детергент сапонін діяв ефективніше, сприяючи збагаченню АТР-азної активності в суспензії сперматозоїдів при оптимальній концентрації $0,05\%$ до рівня $213,29 \pm 8,4\%$ ($M \pm m$, $n = 6$). Тому для подальшої роботи як детергент, фактор пермеабілізації плазматичної мембрани ми вибрали саме сапонін. Цей детергент для визначення ензиматичної активності у сперматозоїдах використовували й інші автори [28].

Для визначення “загальної” АТР-азної активності у сперматозоїдах ми застосували еозин Y – неспецифічний інгібітор АТР-гідролазних систем різних типів [21–23], який оборотно і конкурентно щодо АТР інгібує Na^+ , K^+ , H^+ -АТР-ази та неконкурентно Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азу еритроцитів [22]. Дійсно, попередні експерименти показали, що під час роботи з інтактними сперматозоїдами еозин Y у концентрації 1 мМ інгібує АТР-гідролазну активність (абсолютна величина становить $30,9 \pm 4,5 \text{ нмоль } P_i/\text{хв}$ на 1 мг білка) на $38,8 \pm 6,6\%$ ($M \pm m$, $n = 6$). Це інгібування, скоріше за все, тестує наявність так званих “екто-АТР-аз”, які локалізовані на поверхні сперматозоїдів. Еозин Y-резистентна фермен-

тативна активність складає $61,2 \pm 6,2\%$ ($M \pm m$, $n = 6$).

Подальші експерименти було спрямовано на визначення оптимальної концентрації сапоніну під час інкубації сперматозоїдів в обох типах інкубаційних середовищ (ЗКС та ВКС). Результати дослідів показали, що величина еозин Y-чутливої АТР-азної активності (концентрація інгібітора $[I_{max}] = 1 \text{ мМ}$) залежить від умов інкубації (рис. 1 та 2). Було знайдено, що під час інкубації суспензії сперматозоїдів у ЗКС (оптимальна концентрація сапоніну $0,05\%$) для групи 1 значення цієї активності (нмоль $P_i/\text{хв}$ на 1 мг білка) становила $17,7 \pm 1,9$, а для групи 2 – $14,9 \pm 0,9$. У разі використання ВКС (оптимальна концентрація сапоніну $0,5\%$) величина такої активності (нмоль $P_i/\text{хв}$ на 1 мг білка) для груп 1 і 2 відповідно становила $18,0 \pm 2,5$ та $16,5 \pm 2,2$ ($M \pm m$, $n = 5-8$). Під час титрування суспензії сперматозоїдів сапоніном у ВКС виявилось, що в нормі при оптимальній концентрації детергенту ($0,5\%$) еозин Y-чутлива АТР-азна активність вірогідно зростає у $3,5-4,0$ раз, а при олігозооспермії – лише у $1,3-1,5$ раз. У зв'язку з тим, що подібного ефекту під час інкубації у ЗКС не спостерігалось, подальші експерименти проводили із використанням як середовища інкубації лише ВКС.

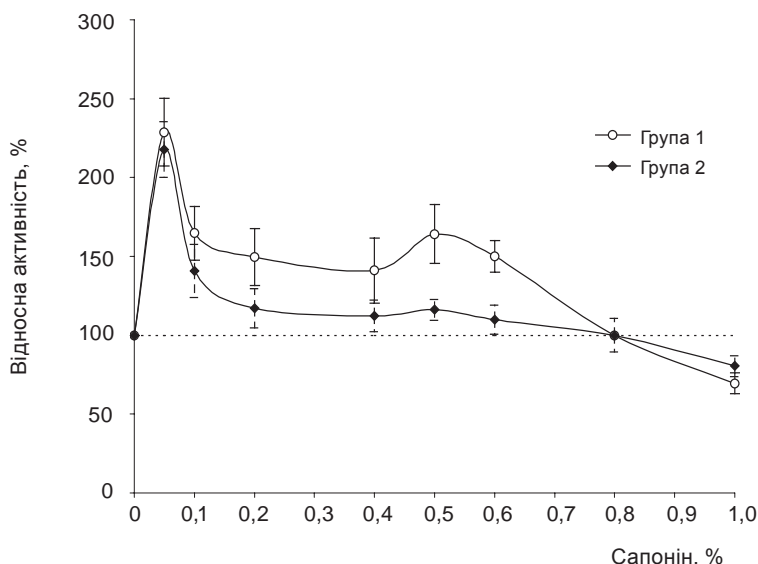


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу сапоніну на значення еозин Y-чутливої АТР-азної активності у сперматозоїдах чоловіків у разі використання зовнішньоклітинного середовища інкубації ($M \pm m$, $n = 5-8$). Концентрація еозину Y – 1 мМ . Контрольне значення ферментативної активності (за відсутності оброблення детергентом) прийнято за 100% і становить $7,8 \pm 1,0$ та $7,7 \pm 2,3 \text{ нмоль } P_i/\text{хв}$ на 1 мг білка у групах 1 і 2 відповідно.

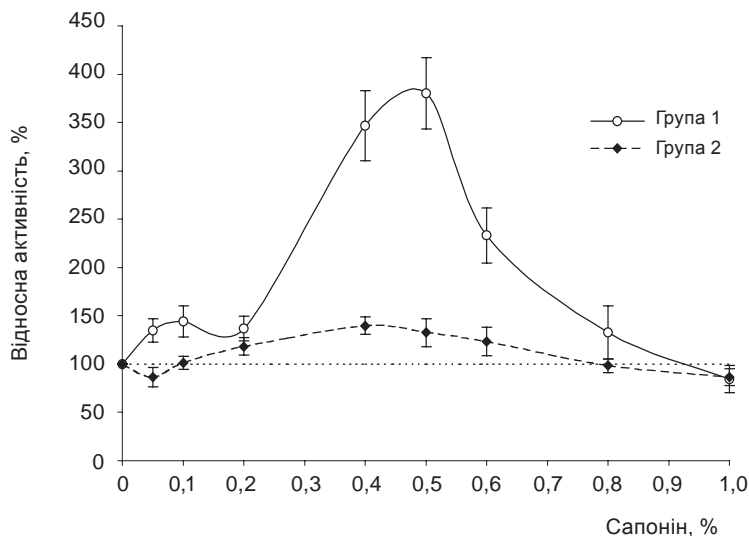


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу сапоніну на значення еозин Y -чутливої АТР-азної активності у сперматозоїдах чоловіків у разі використання внутрішньоклітинного середовища інкубації ($M \pm m$, $n = 5-8$). Концентрація еозину $Y - 1$ мМ. Контрольне значення ферментативної активності (за відсутності оброблення детергентом) прийнято за 100 % і становить $6,0 \pm 1,2$ та $11,7 \pm 2,1$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка у групах 1 і 2 відповідно.

Для перевірки ефективності пермеабілізації спермальних мембран детергентом сапоніном використовували метод лазерно-кореляційної спектроскопії. Одержані результати свідчать на користь того (рис. 3), що ефективний гідродинамічний діаметр сперматозоїдів здорових чоловіків становить 10–15 мкм (без врахування хвостів сперматозоїдів, оскільки

ки ширина їх менше 1 мкм), за оброблення суспензії сперматозоїдів 0,05%-им розчином сапоніну розміри клітин зменшуються до 3–8 мкм; у разі використання 0,5%-го сапоніну їхні розміри зменшуються до 2–3 мкм. Тобто можна стверджувати, що вибраний нами детергент сапонін дійсно ефективно порушує структурну організацію сперматозоїдів.

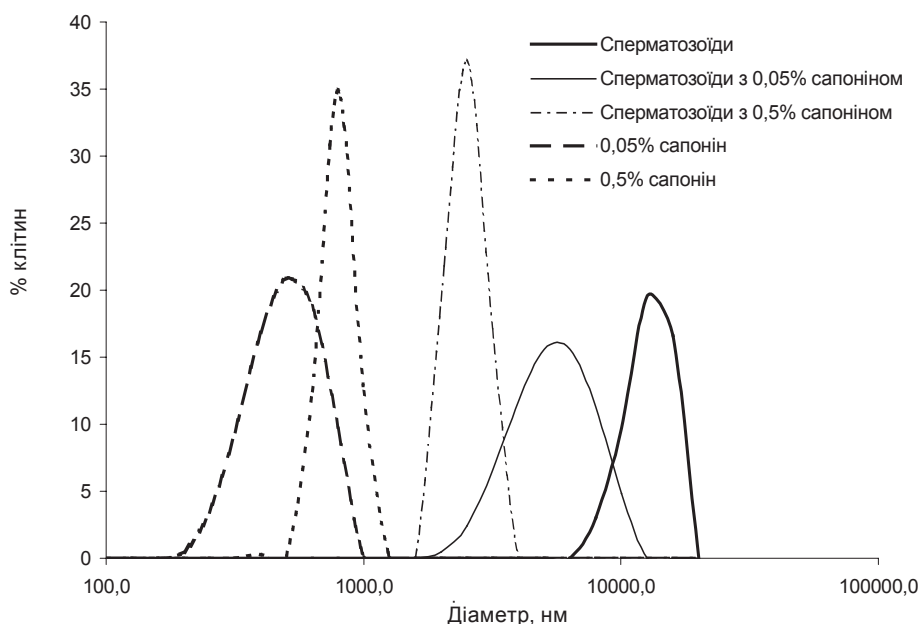


Рис. 3. Вплив різних концентрацій сапоніну на ефективний гідродинамічний діаметр сперматозоїдів чоловіків (типові дані лазерно-кореляційної спектроскопії).

Таким чином, є підстави вважати, що у разі використання для інкубації ВКС, яке містить сапонін в оптимальній концентрації 0,5%, еозин Y-чутливе збільшення (стосовно контролю) АТР-гідролазної активності у сперматозоїдах чоловіків у нормі (група 1) сягає рівня 350–400%, а при олігозооспермії (група 2) – лише 130–150% (рис. 2). Ми вважаємо, що зазначена відмінність у збагаченні еозин Y-чутливої “латентної” АТР-гідролазної активності у сперматозоїдах чоловіків може бути простим та надійним біохімічним тестом на олігозооспермію. Причини встановленого нами зменшення еозин Y-чутливого збагачення АТР-азної активності у сперматозоїдах при олігозооспермії у разі оброблення їхньої суспензії сапоніном потребують з’ясування, але вони узгоджуються із даними [9], що при олігозооспермії знижується активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази. Не виключено, що таке явище пов’язане із можливими порушеннями при олігозооспермії фізико-хімічних та біохімічних властивостей мембран субклітинних структур (ендоплазматичного ретикулума, мітохондрій, спермальних мембран), в яких локалізовані внутрішньоклітинні АТР-гідролазні ферментативні системи (маються на увазі зміни при цій патології фосфоліпідного складу та в’язкості матриксу плазматичної мембрани, вмісту холестеролу в ній, особливостей взаємодії сапонін–мембрана, проникності плазматичної мембрани, внутрішньоклітинних мембран та суто мембранозв’язаних АТР-гідролаз до дії зазначеного детергенту).

2. Каталітичне титрування “латентної” АТР-гідролазної активності еозином Y у суспензії сперматозоїдів чоловіків за норми та при олігозооспермії.

На другому етапі наших досліджень ми вивчали концентраційні залежності дії еозину Y на “латентну” АТР-гідролазну активність у суспензії сперматозоїдів чоловіків за норми та при олігозооспермії. У цій групі дослідів відповідно до даних, одержаних із використанням каталітичного титрування суспензії сперматозоїдів сапоніном та методу лазерно-кореляційної спектроскопії (рис. 2 та 3), використовували ВКС та оптимальну концентрацію сапоніну, що становить 0,5%.

Виявилось, що еозин Y в діапазоні концентрацій від 10^{-6} до 10^{-3} М дозозалежно та ефективно пригнічує АТР-гідролазну активність як в осіб групи 1 (норма), так і групи 2 (олігозооспермія) (рис. 4). В обох випадках повне гальмування еозин Y-чутливої ферментативної активності спостерігається при концентрації 1 мМ. У цих дослідях абсолютне значення АТР-гідролазної активності в контролі (за відсутності інгібітора у середовищі інкубації) для груп 1 та 2 становило $15,1 \pm 1,9$ та $19,5 \pm 2,7$ нмоль P_i /хв на 1 мг білка відповідно. Не можна не звернути увагу на наявність проміжного плато на двох одержаних концентраційних залежностях. На відміну від аналогічних експериментів, де за каталітичного титрування Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази міометрію спостерігається однофазне гальмування активності ензиму [22].

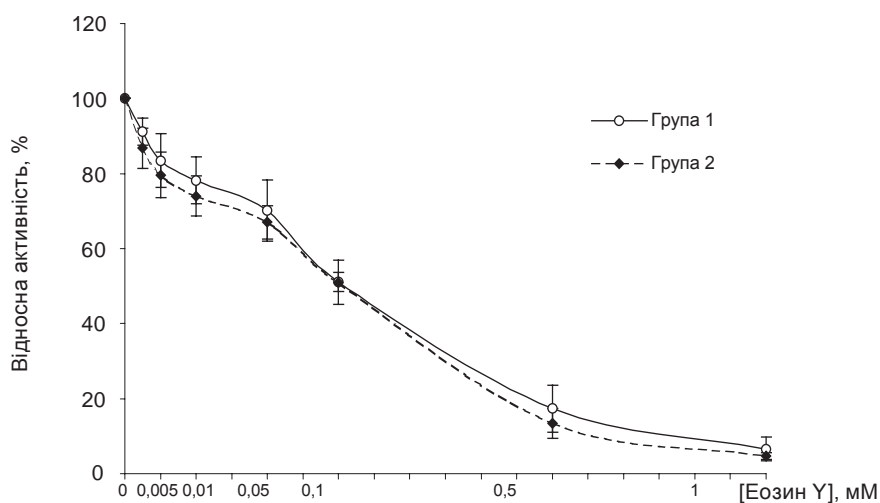


Рис. 4. Вплив різних концентрацій еозину Y на АТР-азну активність сперматозоїдів чоловіків за інкубації у внутрішньоклітинному середовищі ($M \pm m$, $n = 5$). Концентрація сапоніну – 0,5%. Контрольне значення ферментативної активності (за відсутності еозину Y) прийнято за 100%.

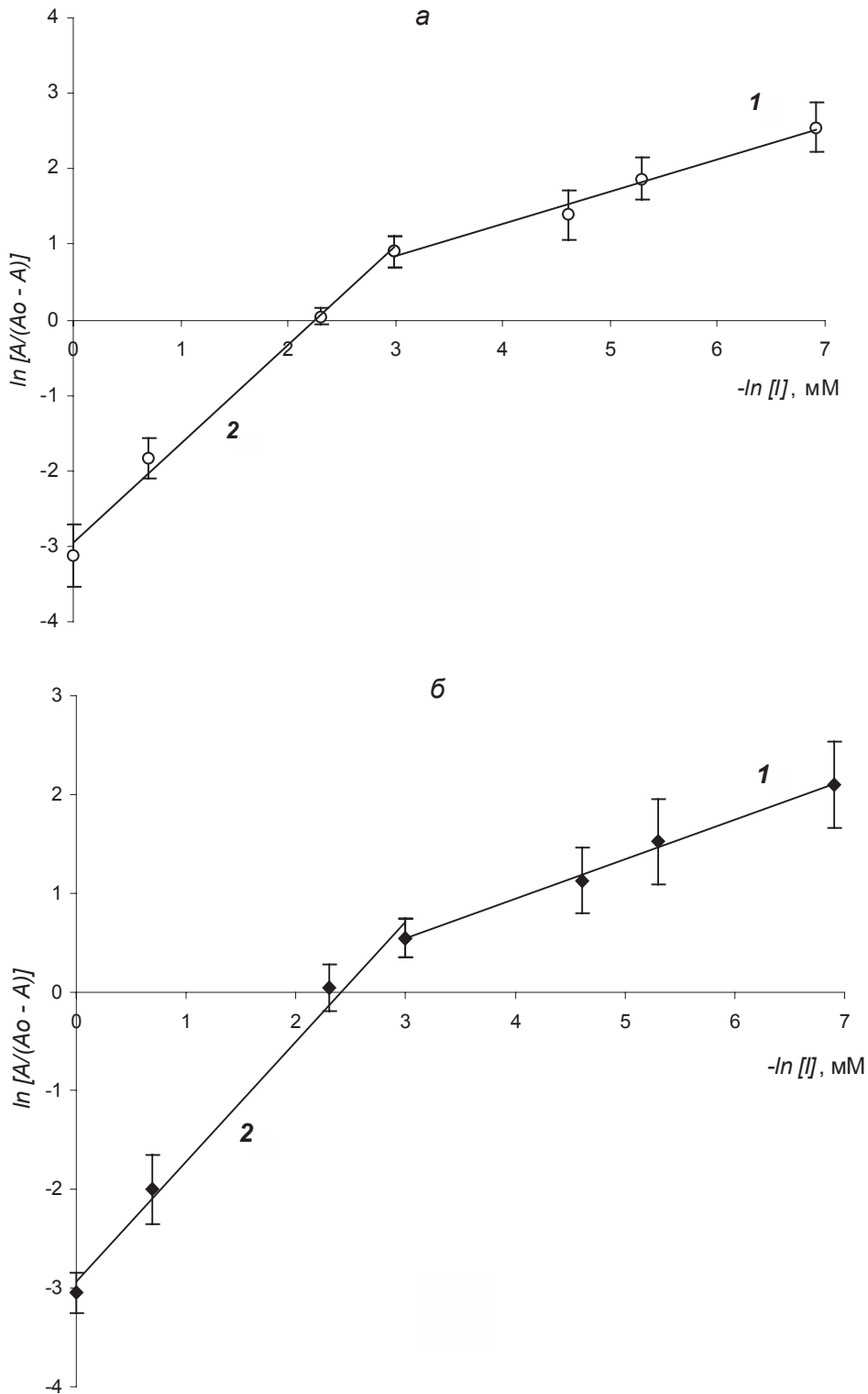


Рис. 5. Лінеаризовані у координатах Хілла усереднені ($n = 5$) криві каталітичного титрування еозином γ АТФ-гідролаз мембранних структур сперматозоїдів чоловіків: а – сперматозоїди пацієнтів групи 1 (норма); б – сперматозоїди пацієнтів групи 2 (олігозооспермія). 1 та 2 – низькоафінна та високоафінна компоненти еозин γ -чутливої АТФ-азної активності відповідно. Концентрація сапоніну – 0,5%. Типові значення коефіцієнта кореляції r становили 0,98–1,0.

Кінетичні показники інгібувального впливу еозину Y на питому АТР-азну активність суспензії сперматозоїдів чоловіків (використовувалося ВКС). Концентрація сапоніну – 0,5 % ($M \pm m$; $n = 5$)*

Еякулят	Компоненти еозин Y-чутливої АТР-азної активності	Уявна константа інгібування, $I_{0,5}$, мМ	Коефіцієнт Хілла, n_i
Норма (група 1)	1. Низькоафінна	$0,37 \pm 0,13$	$0,43 \pm 0,04$
	2. Високоафінна	$0,11 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,08$
Олігозооспермія (група 2)	1. Низькоафінна	$0,31 \pm 0,14$	$0,40 \pm 0,08$
	2. Високоафінна	$0,09 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,14$

* Кінетичні параметри було розраховано із лінеаризованих графіків відповідно до рівняння Хілла: $\ln[A/(A_0 - A)] = -n_H \ln I_{0,5} + n_H \ln[I]$, де A_0 та A – питома АТР-гідролазна активність за відсутності (“нульова точка”) та у присутності в середовищі інкубації еозину Y в концентрації I . Для таких графіків типове значення коефіцієнту кореляції r становить 0,98–1,0.

Лінеаризовані у координатах Хілла $\{\ln[A/(A_0 - A)]; \ln[I]\}$ графіки концентраційних залежностей, наведені на рис. 4, було використано з метою розрахунку кількісних показників (уявна константа інгібування $I_{0,5}$, коефіцієнта Хілла n_H) інгібувальної дії еозину Y (рис. 5, таблиця). За результатами титрування еозином Y як у нормі, так і при олігозооспермії, ми, використовуючи лінеаризовані координати, одержали біфазну залежність (наочною є точка перегину): було ідентифіковано фазу високої ($I_{0,5} \approx 0,1$ мМ) та низької спорідненості ($I_{0,5} \approx 0,3$ – $0,4$ мМ). В обох випадках високоафінна щодо інгібітора фаза концентраційної залежності ферментативної активності має слабу позитивну кооперативність ($n_H \approx 1,2$ – $1,3 \geq 1$), а низькоафінна – суттєву негативну ($n_H \approx 0,4 < 1$).

Отже, одержані дані (рис. 4 і 5, табл.) свідчать про те, що як у нормі, так і при олігозооспермії, в мембранних структурах сперматозоїдів людини ідентифікуються дві складові еозин-чутливої АТР-гідролазної активності щодо дії інгібітора – високо- та низькоафінна. Для першої властива помірна позитивна кооперативність щодо інгібувального впливу еозину Y, а для другої – наочна негативна. Наявність двох складових “латентної” еозин-чутливої АТР-азної активності можливо віддзеркалює гетерогенність (за каталітичними властивостями та субклітинною локалізацією) АТР-гідролазних систем у сперматозоїдах.

Таким чином, у даній роботі розроблено методичні підходи до тестування “загальної” та еозин Y-чутливої АТР-гідролазної активності у сперматозоїдах людини. Із використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії підібрано оптимальний детергент для пермеабілізації спермальних мембран – сапонін. Цей

детергент ефективно перфорує мембрани сперматозоїдів, зменшуючи середній гідродинамічний діаметр клітин від 10–15 мкм (власне сперматозоїди) до 3–8 мкм (у разі оброблення суспензії клітин 0,05%-им розчином сапоніну) і навіть до 2–3 мкм (у разі оброблення суспензії сперматозоїдів 0,5%-им розчином детергенту). Тобто, після оброблення клітин сапоніном їхня мембрана дійсно руйнується, розкриваючи “латентні” активні центри АТР-азних систем, які мають внутрішньоклітинну локалізацію. Виявлено, що неспецифічний інгібітор – еозин Y – ефективно знижує АТР-гідролазну активність інтактних сперматозоїдів на 40%. Дія еозину на пермеабілізовані клітини залежить від складу інкубаційного середовища. При моделюванні зовнішньоклітинних умов (оптимальна концентрація детергенту становить 0,05%) еозин Y-чутлива АТР-гідролазна активність сперматозоїдів у нормі та при олігозооспермії збагачується в середньому на 220–240%. Під час проведення ферментативної реакції при моделюванні внутрішньоклітинних умов (оптимальна концентрація сапоніну – 0,5%) виявлено зростання еозин Y-чутливої АТР-азної активності в нормі до 350–400%, а при олігозооспермії лише в межах 130–150%. Збагачення еозин Y-чутливої АТР-гідролазної активності в нормі у 3,5–4 рази та практично відсутність достовірного її зростання при олігозооспермії можуть бути використані як простий та доступний лабораторний тест на розвиток даної патології чоловічої репродуктивної системи. Еозин Y дозозалежно інгібує “латентну” АТР-азну активність у сперматозоїдах як у нормі, так і при досліджуваній патології. В обох випадках під час лінеаризації кривих каталітичного титрування АТР-азної активності еозином Y у координатах Хілла було виявлене

но двофазну залежність — високої та низької афінності (середні значення уявної константи інгібування $I_{0,5}$ становлять 0,1 та 0,3–0,4 мМ відповідно). При цьому як у нормі, так і при олігозооспермії, для високоафінної компоненти властивою є позитивна кооперативність, а для низькоафінної — негативна.

Одержані дані можуть мати теоретичне і практичне значення для з'ясування мембранних механізмів, задіяних у підтримці іонного гомеостазу у сперматозоїдах людини та його порушень при різноманітних патологічних станах; слугувати теоретичною основою для подальшого вдосконалення лабораторних біохімічних методів, спрямованих на надійне тестування олігозооспермії. Подальшу нашу роботу буде спрямовано на ідентифікацію з використанням селективних інгібіторів окремих АТР-гідролазних ферментативних систем (уабаїн, тапсигаргін, циклопіазонієва кислота, азид, SH-реагенти тощо [24, 29, 30, 32]) — парціальних складових еозин Y-чутливої АТР-азної активності сперматозоїдів чоловіків у нормі та при олігозооспермії.

Автори висловлюють подяку д.м.н., проф. М. І. Бойку та Б. К. Лубенець (Інститут урології АМН України) за надання клінічного матеріалу та допомогу в інтерпретації даних, члену-кор. НАН України С. О. Костеріну за надану можливість виконання деяких експериментальних досліджень у відділі біохімії м'язів (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України) та цінні рекомендації і зауваження під час обговорення результатів, а також к.ф.-м.н В. Ф. Горчеву (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України) за допомогу у проведенні дослідів із використанням методу лазерно-кореляційної спектрофотометрії.

ЭОЗИН Y-ЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ АТР-АЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ МУЖЧИН КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ ТЕСТ НА ОЛИГОЗОСПЕРМИЮ

Н. С. Кочешкова, З. Д. Воробец

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, Украина;
e-mail: contact@mail.lviv.ua

На препаратах сперматозоидов мужчин репродуктивного возраста (27–44 лет), исследовали чувствительную к ингибирующему действию эозина Y АТР-азную активность в норме и при олігозооспермії, в условиях обработки клеточной суспензии различными

детергентами. Разработаны методические подходы тестирования так называемой “общей” и эозин Y-чувствительной АТР-гидролазной активности сперматозоидов. С помощью метода лазерно-корреляционной спектроскопии подобран оптимальный детергент для пермеабиллизации спермальных мембран — сапонин. Сапонин эффективно перфорирует мембраны сперматозоидов, уменьшая их средний гидродинамический диаметр с 10–15 мкм (целые сперматозоиды) до 3–8 мкм при обработке суспензии клеток 0,05%-ым раствором детергента, и до 2–3 мкм при использовании 0,5%-го раствора. Неспецифический ингибитор АТР-гидролазных систем эозин Y эффективно снижает АТР-азную активность интактных сперматозоидов практически на 40%. Эффект эозина зависит от состава инкубационной среды. При использовании среды инкубации с катионным составом, характерным для внеклеточных условий (оптимальная концентрация сапонины 0,05%) эозин Y-чувствительная АТР-азная активность в сперматозоидах в норме и в условиях олигозооспермії увеличивается в среднем на 220–240%. При проведении ферментативной реакции во внутриклеточных условиях (оптимальная концентрация сапонины — 0,5%) обнаружено увеличение АТР-гидролазной активности в норме до 350–400%, а при наличии олигозооспермії — всего до 130–150%. Эта особенность может быть использована в качестве простого и доступного лабораторного теста на развитие данной патологии мужской репродуктивной системы. Эозин Y дозозависимо и эффективно ингибирует “латентную” АТР-азную активность сперматозоидов как в норме, так и при наличии исследуемой патологии. В обоих случаях при линеаризации кривых каталитического титрования АТР-азной активности эозином Y в координатах Хилла обнаружена двухфазная зависимость — высокой и низкой афінності (средние значения кажущихся констант ингибирования $I_{0,5}$ составляют 0,1 и 0,3–0,4 мМ соответственно). При этом как в норме, так и при олигозооспермії для высокоафінной компоненты характерна позитивная кооперативность, а для низькоафінной — негативная (тестировалось по величине коэффициента Хилла n_H). Полученные данные имеют фундаментальное и практическое значение для дальнейшего изучения мембранных механизмов, участвующих в поддержании ионного гомеостазу сперматозоидов человека и его нарушений при развитии различных патологий, а также служит теоретической основой для усовершенствования лабораторных биохимических методов.

мических методов, направленных на тестирование такой патологии как олигозооспермия.

Ключевые слова: сперматозоиды, олигозооспермия, АТФ-азная активность, лазерно-корреляционная спектроскопия, сапонин, эозин Y.

EOZIN Y-SENSITIVE ATPase ACTIVITY IN MEN'S SPERMATOZOIDS AS A BIOCHEMICAL TEST FOR OLIGOZOOSPERMIA

N. S. Kocheshkova, Z. D. Vorobets

Danylo Galytyskiy Lviv Medical University, Ukraine;
e-mail: contact@mail.lviv.ua

S u m m a r y

The experiments performed on preparations of spermatozooids of men of reproductive age (27–44-year old) studied the ATPase activity (sensitive to inhibited effects of eosine Y) in both normal and oligozoospermia conditions when treating cell suspension with detergents. The methodical approaches for testing the so-called “common” and eosin Y-sensitive ATP-hydrolase activities in spermatozooids were developed. Saponin, the optimal detergent for permeabilisation of their plasma membrane was chosen using laser-correlational spectroscopia method. Saponin perforates effectively the membranes of spermatozooids, decreasing the average hydrodynamical diameter of cells from 10–15 μm (the spermatozooids themselves) to 3–8 μm (treating cell suspension with 0.05% solution of saponin) and even to 2–3 μm (treating spermatozooids suspension with 0.5% solution of detergent). A non-specific inhibitor of ATP-hydrolase's systems, eosin Y, decreases effectively the ATP-hydrolase activity of intact spermatozooids up to 40%. The exact effect of eosin depends on composition of incubation medium. In the model of extracellular conditions (the optimal concentration of detergent is 0.05%), eosin Y-sensitive ATP-hydrolase's activity of spermatozooids in both normal and oligozoospermia cases is increased by 220–240% (at an average). If enzymatic reaction was performed during intracellular conditions modeling (the optimal concentration of saponin is 0.5%), the increase of eosin Y-sensitive ATPase activity (up to 350–400% in normal conditions, and only to 130–150% in oligozoospermia conditions) was detected. This specificity can be used as easy-to-use clinical test for such pathology of men's reproductive system. Eosin Y inhibited doze-dependently the common ATPase activity in spermatozooids in both normal

and with studied pathology. In both cases, after linearization of curves of catalytic titration of ATPase activity with eosin Y in Hill's plot the two-phase dependency, of high and low affinities, was found (the average values of imaginary inhibition constant $I_{0,5}$ are 0.1 and 0.3–0.4 mM correspondingly). In both normal and oligozoospermia conditions, the high-affinity component has a positive cooperativity, while the low-affinity component is characterized by a negative cooperativity. The obtained results may be of both theoretical and practical value for further investigation of membrane mechanisms used in the support of ion homeostasis in men's spermatozooids and its violation in conditions under different pathological states. Besides, the results can be used as a theoretical basis for improvement of simple and accessible clinical biochemical methods used for testing such a pathology as oligozoospermia.

Key words: spermatozoid, oligozoospermia, ATPase activity, laser-correlation spectrophotometry, saponin, eosin Y.

1. *World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen Cervical Mucus Interaction.* / Cambridge: University press, 1999. – 128 P.
2. *Menkveld R., Wong W. Y., Lombard C. J. et al.* // Hum. Reprod. – 2001. – **16**, N 6. – P. 1165–1171.
3. *Бойко Н. И., Борисенко Ю. А., Быстров А. А. и др.* Сексология и андрология. К.: Абрис, 1997. – 880 с.
4. *Леонов Б. В., Беляева А. А., Кузьмичев Л. И., Масесова Р. Е.* // Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия / Под редакцией В. И. Кулакова, Б. В. Леонова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – С. 221–249.
5. *Національна програма “Репродуктивне здоров'я 2001–2005”.* – К.: МОЗ України, 2000. – 33 с.
6. *Статистичний щорічник України за 2004 р.* / Під ред. О. Г. Осауленка. – К.: Техніка, 2005. – 592 с.
7. *Sigman M., Glass S., Campagnone J., Pryor J. L.* // Fertil. Steril. – 2006. – **85**, N 5. – P. 1409–1414.
8. *Krausz C., Forti G.* // Cell Tissue Bank. – 2006. – **7**, N 2. – P. 105–112.
9. *Stegmayr B., Gottfries A., Ronquist G., Brody I.* // Scand. J. Urol. Nephrol. – 1980. – **14**, N 2. – P. 129–134.

10. *Crosignani P. G.* // Hum. Reprod. Update. — 2004. — **10**, N 4. — P. 295–307
11. *Aitken R. J.* // Mol. Hum. Reprod. — 1997. — **3**, N 3. — P. 169–173.
12. *Benoff S.* // Front. Biosci. — 1998. — N 3. — P. D1220–D1240.
13. *Fraire-Zamora J. J., Gonzalez-Martinez M. T.* // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2004. — **287**. — P. C1688–C1696.
14. *Schuh K., Cartwright E. J., Jankevics E.* // J. Biol. Chem. — 2004. — **279**, N 27. — P. 28220–28226.
15. *Romac P., Zanic-Grubisic T., Culic O. et al.* // Hum. Reprod. — 1994. — **9**, N 8. — P. 1474–1478.
16. *Edvinsson A., Heyden G., Steen Y., Nilsson S.* // Int. J. Androl. — 1981. — **4**, N 3. — P. 297–303.
17. *Dragileva E., Rubinstein S., Breitbart H.* // Biol. Reprod. — 1999. — **61**. — P. 1226–1234.
18. *Dorval V., Dufour M., Leclerc P.* // Ibid. — 2002. — **67**. — P. 1538–1545.
19. *Wennemuth G., Babcock D. F., Hille B.* // J. General Physiology. — 2003. — **122**, N 1. — P. 115–128.
20. *Evans J. H., Spencer D. M., Zweifach A., Leslie C. C.* // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 32. — P. 30150–30160.
21. *Skou J. C., Esmann M.* // Biochem. Biophys. Acta. — 1981. — **647**, N 2. — P. 232–240.
22. *Слінченко Н. М., Черниш І. Г., Костерін С. О.* // Укр. біохім. журн. — 2003. — **75**, № 3. — С. 50–53.
23. *Esmann M., Fedosova N. U.* // Eur. Biophys. J. — 2004. — **33**, N 8. — P. 683–690.
24. *Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П.* // Укр. біохім. журн. — 2002. — **74**, № 1. — С. 42–48.
25. *Lowry O. H., Rosenbough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**, N 1. — P. 265–275.
26. *Барсуков Л. И.* // Соросовский Образовательный Журнал. — 2004. — **8**, № 1. — С. 10–16.
27. *Mollova M., Atanassov B., Nedkova R., Kyurkchiev S.* // Reprod. Biol. — 2006. — **6**, N 1. — P. 79–94.
28. *Максим'юк Г. В., Бойко М. І., Воробець З. Д.* // Практична медицина. — 2003. — **IX**, № 4. — С. 86–89.
29. *Jones A. R., Bubb W. A.* // J. Reprod. Fertil. — 2000. — **119**. — P. 129–135.
30. *Rathbun W., Betluch V.* // Ibid. — 1969. — **28**. — P. 436–445.
31. *Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г.* Биокинетика: практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. — 720 с.
32. *Wang H., Haas M., Liang M. et al.* // J. Biol. Chem. — 2004. — **279**, N 17. — P. 17250–17259.

Отримано 13.09.2006