

ROMAN SŁAWETA, TERESA LASKOWSKA*, GRAŻYNA SOSIŃSKA**

Wpływ zmienności osobniczej na aktywność peroksydazy glutationowej i poziom zredukowanego glutationu w nasieniu buhajów*)

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna
 *Zakład Biochemii Instytutu Biofarmacji AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
 **Stacja Hodowli i Unasienniania Zwierząt w Kocierzowach, 97-545 Gomunice

Peroksydaza glutationowa (GSH-Px, EC 1.11.1.9) jest enzymem katalizującym utlenianie zredukowanego glutationu (GSH) z jednoczesnym rozkładem nadtlenków. Przy niedoborze GSH-Px i GSH gromadzą się nadtlenki organiczne i nadtlenek wodoru, szkodliwe dla błon komórkowych (3). Niedobór GSH-Px zaliczany jest do enzymopatii uwarunkowanych genetycznie, główny zaś objaw kliniczny to występująca skłonność do hemolizy (4). Także poziom GSH w tkankach wydaje się być uwarunkowany genetycznie, gdyż np. we krwi człowieka określony poziom GSH dziedziczy się jako cecha autosomalna dominująca (8). U owiec o niskim poziomie GSH w erytrocytach stwierdzono zwiększoną podatność zarówno na anemię, jak i zamieralność jagniąt, a w krwinkach czerwonych znajdowało się dużo ciałek Heinza (16, 17).

Plemnikiobójcze nadtlenki lipidów i nadtlenek wodoru tworzą się w męskim układzie rozrodczym w procesach fizjologicznych, między innymi w biosyntezie prostaglandyn w dodatkowych gruczołach płciowych (15). Także z martwych plemników buhaja dochodzi do uwalniania oksydazy L-aminokwasów, enzymu katalizującego reakcję utleniania L-tyrozyny, L-fenylalaniny oraz L-tryptofanu, będących składnikami plazmy nasienia (10). Jednym z końcowych produktów tej przemiany jest nadtlenek wodoru (9).

W nasieniu buhaja aktywność zależnej od selenu peroksydazy glutationowej stwierdzono głównie w plazmie nasienia, a tylko śladową w plemnikach (2, 14). Aktywność wymienionego enzymu wpływa dodatnio na liczbę plemników morfologicznie nie zmienionych (1). Zredukowany glutation występuje zarówno w plazmie nasienia buhaja, jak i w plemnikach (13).

Biorąc pod uwagę, że nasienie buhaja nie zawiera katalazy lub tylko jej śladową aktywność, obecność peroksydazy glutationowej i zredukowanego glutationu może być w warunkach tlenowych czynnikiem zabezpieczającym plemniki przed uszkodzeniami. Celem pracy było zbadanie aktywności peroksydazy glutationowej i poziomu zredukowanego glutationu w nasieniu z uwzględnieniem różnic występujących pomiędzy buhajami.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 20 buhajach pochodzących od 7 ojców. Buhaje były użytkowane rozplodowo w SHiUZ Kocierzowy. Aktywność GSH-Px określono w 120 pełnych ejakulatach, zaś poziom GSH w 214 zarówno w plemnikach, jak i plazmie nasienia. Od każdego buhaja pobrano przynajmniej 5 ejakulatów. Aktywność GSH-Px oznaczano według adaptowanej metody Paglia i Valentin'a (7) w modyfikacji Hopkinsa i Tudhopa (5). Zasada pomiarów aktywności była reakcja zużywająca NADPH₂, w której utleniony glutation (GSSG) powstały pod wpływem obecnej w nasieniu GSH-Px i egzogennej reduktazy glutationowej, został zredukowany z równoczesnym utlenieniem koenzymu. Aktywność enzymu mierzono spadkiem ekstynkcji przy 340 nm związanej z obniżeniem się zawartości NADPH₂ użytego do redukcji GSSG. W celu oznaczenia GSH-Px, 0,1 ml ejakulatu rozcieńczano w 0,9 ml 15 nM buforu fosforanowego pH 7,6, wirowano 15 minut w temperaturze 4°C przy 2000 g i płyn nad osadu stosowanego do oznaczeń. Mieszana reakcyjna zawierała 50 µl supernatantu, 2,4 ml 0,15 M buforu fosforanowego pH 7,0 z dodatkiem 1 mM azydku sodu. Po 10 minutach preinkubacji w temperaturze pokojowej, dodawano 0,2 ml 0,15 M GSH, 0,2 ml 4,2 mM NADPH₂ i 1 jednostkę reduktazy glutationowej. Roztwór ten inkubowano w ciągu 5 minut w 25°C. Reakcję zapoczątkowano dodaniem 0,1 ml 2,2 mM nadtlenku wodoru w przypadku oznaczania aktywności zależnej od selenu GSH-Px, całkowitej zaś 1,5 mM nadtlenkiem kumenu (6). Spadek ekstynkcji rejestrowano co 5 minut. Miarą aktywności była ilość umoli utlenionego NADPH₂/min/ml nasienia, po odjęciu ilości utlenionego NADPH₂ w reakcji nieenzymatycznej. Przy obliczaniu aktywności GSH-Px posłużono się współczynnikiem ekstynkcji molarnej wynoszącej dla NADPH₂ 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹.

Szczegółowe postępowanie metodyczne odnośnie GSH opisano w poprzedniej pracy (13).

W statystycznej analizie wyników, obliczono średnie arytmetyczne (\bar{x}) i odchylenia standardowe (s). W celu wykazania zmienności osobniczej w analizowane cechy nasienia zastosowano metodę analizy wariancji jednoczynnikowej w układzie nieortogonalnym.

Wyniki i omówienie

Pomiar aktywności enzymu z zastosowaniem jako substratu nadtlenku kumenu wykazał, że średnia aktywność całkowitej peroksydazy glutationowej (GSH-Px) w ejakulatach buhajów wyniosła 13,0 do 26,2 µmole/ml, z tego białka enzymatycznego związanego z selenem (nadtlenek wodoru, jako substrat) 3,7 do 8,5 µmole/ml (tab. 1). Aktywność enzymu bezselenowego stanowiło 46,8 do 77,5% całkowitej aktywności GSH-Px. Nie związaną z selenem peroksydazę glutationową identyfikuje się, ja-

*) Praca wykonana w ramach podprogramu CPBP 05.06.1 „Fizjologiczne mechanizmy regulacji rozrodo”

Tab. 1. Aktywność całkowitej i zależnej od selenu peroksydazy glutationowej oraz poziom zredukowanego glutationu w nasieniu buhajów

Nazwa ojca buhajów	Nazwa buhaja	Peroksydaza glutationowa				nie-Se-zależna (% całkowitej)	Zredukowany glutation					
		całkowita ($\mu\text{mole/ml}$)		se-zależna ($\mu\text{mole/ml}$)			n	plemniki ($\text{nmole}/10^9\text{pl.}$)		plazma nasienia (μM)		
		n	\bar{x}	s	\bar{x}	s		\bar{x}	s	\bar{x}	s	
Klejnisty	Kłus	6	23,7	3,7	7,1	0,8	70,1	17	28,5	11,4	28,7	7,0
	Klamut	6	21,8	4,5	7,9	1,0	63,8	11	29,4	10,1	28,0	5,1
	Korsarz	6	22,2	4,6	5,6	1,2	74,8	10	32,3	11,0	31,3	8,9
	Kleszcz	6	25,2	4,8	8,3	1,1	67,1	10	26,7	7,1	28,1	5,0
	Kolec	6	26,2	4,9	7,4	0,2	71,8	10	26,9	7,2	27,6	3,8
	Kłusak	6	24,0	3,4	5,4	1,3	77,5	8	27,5	16,1	26,0	6,5
	Kramik	6	21,7	3,5	8,5	0,6	60,9	5	26,0	6,0	28,6	7,0
Etol	Etyl	6	13,3	2,4	6,1	0,8	54,2	8	21,3	8,5	28,1	5,9
	Eron	6	14,0	3,5	3,7	1,3	79,6	14	23,5	6,7	26,1	5,4
	Egal	6	13,0	3,7	5,0	1,6	61,6	13	23,6	10,0	25,0	8,4
	Elew	6	13,2	3,7	4,7	0,9	64,4	11	23,5	8,8	23,3	6,4
Roland	Rywał	6	14,1	3,2	5,0	1,4	64,6	16	36,6	17,8	29,0	8,9
	Romel	5	15,6	3,3	8,3	0,9	46,8	8	40,7	25,2	24,5	5,2
	Radar	5	14,9	4,5	5,4	2,2	63,8	5	24,0	11,9	19,0	2,4
Finat	Fantom	6	14,6	3,5	5,0	1,1	65,8	16	30,7	13,5	26,7	6,5
	Fez	5	14,4	1,7	4,8	0,5	66,7	5	26,0	3,3	24,6	2,8
Pawnee	Prom	7	25,7	4,7	8,3	1,3	67,8	9	31,7	14,6	25,0	5,5
	Pak	7	25,3	6,4	7,9	1,0	68,8	7	30,8	7,2	23,5	2,8
Frans	Filut	6	24,7	4,3	6,6	0,6	73,3	14	28,5	14,5	24,5	5,9
Adelbert	Adok	7	16,2	3,6	6,2	2,2	61,8	46	33,0	16,2	24,7	5,0

Tab. 2. Analiza wariancji dla aktywności całkowitej i zależnej od selenu peroksydazy glutationowej oraz poziom zredukowanego glutationu w nasieniu buhajów

Rodzaj zmienności	Aktywność peroksydazy glutationowej					Poziom zredukowanego glutationu				
	całkowita		Se-zależna			plemniki			plazma nasienia	
	n'	S ²	F	S ²	F	n'	S ²	F	S ²	F
Różnice osobnicze	19	161,35	9,74 ^{xx}	13,39	8,53 ^{xx}	19	233,31	1,43	62,50	1,51
Błąd	100	16,55		1,56		194	163,10		41,34	

Objaśnienia: n' — liczba stopni swobody, S² — średni kwadrat, F — wartość testu F, xx — istotna przy $p \leq 0,01$.

ko jedną z transferaz -S glutationu biorącą udział w przenoszeniu zredukowanego glutationu przez błony (11). Niedobór selenu w diecie powoduje spadek aktywności Se GSH-Px, przy czym następuje rekompensacyjny wzrost aktywności nie-Se GSH-Px (18).

Pośród przebadanych ejakulatów najwyższą aktywność całkowitą GSH-Px stwierdzono w nasieniu buhajów o nazwie: Kolec (26,2 $\mu\text{mole/ml}$) i Kleszcz (25,2 $\mu\text{mole/ml}$) oraz Prom (25,7 $\mu\text{mole/ml}$) i Pak (25,3 $\mu\text{mole/ml}$), najniższą zaś w ejakulatach Egala (13,0 $\mu\text{mole/ml}$), Elewa (13,2 $\mu\text{mole/ml}$) oraz Etyla (13,3 $\mu\text{mole/ml}$). Zależna od selenu GSH-Px była najaktywniejsza w nasieniu buhajów: Kramika (8,5 $\mu\text{mole/ml}$), Kleszcza (8,3 $\mu\text{mole/ml}$) oraz u Ero-na (3,7 $\mu\text{mole/ml}$), Elewa (4,7 $\mu\text{mole/ml}$) i Feza (5 $\mu\text{mole/ml}$). W przebadanych ejakulatach procentowy udział enzymu niezależnego od selenu był najwyższy u Kłusaka (77,5%) i Korsar-

za (74,8%), najniższy zaś u Romela (46,8%) i Etyla (54,2%).

Najwyższą zawartość GSH wykazano w plemnikach buhajów o nazwie: Romel (40,7 $\text{nmole}/10^9$ plemników) i Rywał (36,6 $\text{nmole}/10^9$ plemników), najniższą zaś u Egala (23,6 $\text{nmole}/10^9$ plemników) oraz Etyla (27,3 $\text{nmole}/10^9$ plemników). Stężenie pozakomórkowego GSH najwyższe było w ejakulatach buhajów o nazwie: Korsarz (31,3 μM), Rywał (29,0 μM), Kłus (28,7 μM), Kleszcz (28,1 μM) oraz Klamut (28,0 μM), najniższe zaś w plazmie nasienia buhaja Radara (19,0 μM), Elewa (23,3 μM) oraz Paka (23,5 μM).

Analiza wariancji (tab. 2) wykazała istotny wpływ osobniczy na aktywność całkowitej ($p \leq 0,01$) i zależnej od selenu ($p \leq 0,01$) peroksydazy glutationowej, brak zaś wpływu osobniczego na poziom zredukowanego glutationu zarówno w plemnikach, jak i plazmie nasienia ($p > 0,05$).

Z przeprowadzonych obserwacji nad zróżnicowaniem indywidualnym aktywności GSH-Px w nasieniu buhaja wynika, że Kleszcz i Kolec pochodzące od Kleinhistera oraz Prom i Pak od Pawnee Farm, charakteryzowały się najwyższą aktywnością całkowitej GSH-Px, zaś buhaje: Egal, Elew, Etyl i Eron pochodzące od Etola najniższą. Enzym związany z selenem najaktywniejszy był w ejakulatach buhajów o nazwie: Kramik i Kleszcz od ojca Kleinhistera i najmniej aktywny u Erona i Elewa pochodzących od Etola. Obserwacje te wskazują, że aktywność peroksydatywna nasienia buhaja może być w pewnym stopniu determinowana genetycznie.

W plazmie nasienia najwyższe stężenie zredukowanego glutationu wykazano w ejakulatach takich buhajów jak: Korsarz, Kłus, Kleszcz oraz Klamut od ojca Kleinhistera. Najniższą zawartość GSH w plemnikach stwierdzono u synów buhaja o nazwie Etol, najwyższą zaś u Rywała i Romela od ojca Rolanda.

Poziom GSH również różny w ejakulatach od różnych buhajów nie wydaje się być uwarunkowany genetycznie w takim stopniu, jak aktywność peroksydazy glutationowej. Przypuszczalnie zatem określenie tendencji genetycznych, dotyczących różnic w poziomie GSH w nasieniu buhajów, możliwe będzie po przeprowadzeniu obserwacji na większej liczbie potomstwa od tego samego buhaja.

Wnioski

1. Aktywność peroksydazy glutationowej w ejakulatach buhajów wykazuje wyraźną zmienność osobniczą; zmienności tej brak w poziomie zredukowanego glutationu zarówno w plemnikach, jak i plazmie nasienia.
2. W nasieniu buhajów 46,8 do 77,5% całkowitej aktywności peroksydazy glutationowej stanowi białko enzymatyczne nie związane z selenem.

Piśmiennictwo

1. Bartle J. L., Senger P. L.: J. Anim. Sci. 51, 258, 1980.
2. Brown D. V., Senger P. L., Stone L. S., Froseth J. A., Becker W. C.: J. Reprod. Fert. 50, 117, 1977.
3. Chance B., Stes H., Bovaris A.: Physiol. Rev. 59, 527, 1979.
4. Flohé L.: Klin. Wschr. 49, 671, 1971.
5. Hopkins J., Tudhope G. R.: Br. J. Haemat. 25, 563, 1973.
6. Lawrence R. A., Parkhill L. K., Burk R. F.: J. Nutr. 198, 981, 1978.
7. Paglia D. E., Valentine W. N.: J. Lab. clin. Med. 70, 158, 1967.
8. Prins H. K., Dort M., Loos J. A., Zurcher C., Beckers T.: Blood 27, 145, 1966.
9. Shannon P., Curson B.: J. Dairy Sci. 55, 614, 1972.
10. Shannon P., Curson B.: J. Reprod. Fert. 64, 463, 1982.
11. Sies H., Wendel R., Burk R. F.: Se and non-Se glutathione peroxidases: enzymology and cell physiology, red. T. E. King i wsp. s. 169, Pergamon Press, Oxford, New York, 1982.
12. Sławeta R., Laskowska T., Sosińska G.: Medycyna Wet. 41, 685, 1985.
13. Sławeta R., Laskowska T.: Acta physiocl. pol. 36, 197, 1985.
14. Smith D. G., Senger P. L., McCuichan J. F., Landa C. A.: Biol. Reprod. 20, 377, 1979.
15. Tan W. C., Privett O. S.: Lipids, 7, 622, 1972.
16. Tucker E. M., Kilgour L.: Res. vet. Sci. 14, 306, 1973.
17. Tucker E. M., Kilgour L., Young J. O.: J. agric. Sci. Camb. 87, 315, 1976.
18. Wills E. D.: The role of dietary components in oxidative stress in tissues, red. H. Sies, s. 197, Academic Press, 1985.

Adres autora: dr Roman Sławeta, ul. Belska 28 m. 20, 02-638 Warszawa

Славета Р., Лясковская Т., Сосинская Г. — Влияние индивидуальной изменчивости на активность глутатионовой пероксидазы и уровень редуцированного глутатиона в бычьем семени

Определили активность полной и зависимой от селена глутатионовой пероксидазы в бычьих эякулятах, а также уровень редуцированного глутатиона как в живчиках, так и в плазме семени.

Показали существенное ($p \leq 0,01$) индивидуальное влияние на активность полной и зависимой от селена глутатионовой пероксидазы. Этой изменчивости нет в уровне редуцированного глутатиона как в живчиках, так и в плазме семени ($p > 0,05$). Отметим, что активность полной глутатионовой пероксидазы составила 13,0—26,2 $\mu\text{mole}/\text{мл}$, из того активность enzymатического белка, связанного с селеном, 3,7—8,5 $\mu\text{mole}/\text{мл}$. Содержание редуцированного глутатиона в живчиках располагалось в пределах 21,3—40,7 $\mu\text{mole}/10^9$ живчиков, в плазме семени же 19,0—31,3 μmole . Полученные результаты внушают, что индивидуальные различия в активности глутатионовой пероксидазы в бычьем семени могут быть вызваны в значительной степени генетическими влияниями.

Sławeta R., Laskowska T., Sosińska G. — Effect of individual variability on the activity of glutathione peroxidase and the level of reduced glutathione in sperm of bulls

The activity of a total and selenium dependent glutathione peroxidase in ejaculates of bulls and the level of reduced glutathione both in spermatozoons and in plasma semen were determined. It was found a statistically significant individual ($p \leq 0,01$) influence of the activity of a total and selenium dependent glutathione peroxidase. This variability in the level of reduced glutathione both in spermatozoons and in plasma semen is lacking ($p > 0,05$). It was found that the activity of a total glutathione peroxidase was 13.0—26.2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ and the activity of selenium dependent enzymatic protein was 3.7—8.5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. The content of a reduced glutathione in spermatozoons was 21.3—40.7 $\mu\text{mol}/10^9$ spermatozoons, and in plasma semen 19.0—31.3 μM . These results suggest that some individual differences in the activity of glutathione peroxidase in bull semen may result from genetical differences.

REIM K. A., BULL R. W., COFFMAN P., RASKIN R. E. — Profile immunologiczne u kotów z trwałym naturalnym zakażeniem wirusem białaczki. (Immunologic profiles of cats with persistent, naturally acquired feline leukemia virus infection). Am. J. vet. Res. 47, 1935—1939, 1986 (9)

Określono liczbę leukocytów, limfocytów, wytwarzanie rozetek E i EAC, proliferację limfocytów, poziom IgG u kotów zdrowych i zakażonych trwale wirusem białaczki kociej (FeLV) z wiramią i bez wirami. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między obydwoma grupami zwierząt w poziomie krwinek białych, odsetku limfocytów i monocytów, proliferacji limfoblastycznej, tworzeniu rozetek i stężeniu IgG. Wszystkie koty z wiramią nie wykazywały przy tym żadnych zaburzeń klinicznych. Syndrom niedoboru immunologicznego nie występował u kotów z zakażeniem szpiku kostnego. Przyczyna występowania tego zjawiska nie jest dotychczas wyjaśniona. Być może jest ona następstwem różnic w odporności gospodarza względnie różnic w zjadliwości różnych szczepów wirusa FeLV.

G.