

RAZLIKE U AKTIVNOSTI ENZIMA: BETA - GLUKURONIDAZE, AST I ARGINAZE U EJAKULATIMA BIKOVA OVISNO O PLODNOSTI

Melita Herak, M. Herak, B. Premzl, D. Viduč,
Dubravka Dejanović, R. Mihajlović

Sažetak

Istraživanja su obavljena na dvije skupine bikova iz Centra za umjetno osjemenjivanje. U prvoj grupi bilo je 25 plodnijih bikova s non returnom od 60-75%, od kojih je uzet 41 ejakulat. U drugoj grupi bilo je 18 bikova s nižim non returnom od 50-60% od kojih je uzeto 39 ejakulata. Centrifugiranjem odvojena je sjemena plazma a spermiji su razoreni hipotonijom te je odvojen ekstrakt spermija. U svakom uzorku sjemene plazme i ekstrakta spermija određena je aktivnost beta-glukuronidaze po Fischmanu (1955), AST Boehringerovim test reagencijama, a aktivnost arginaze po Brownu i Cohenu (1960). Aktivnosti su izražene u 1 sjemene plazme odnosno "U" na 10^9 spermija.

Rezultati pretraga obrađeni su uobičajenim statističkim metodama, a signifikantnost razlika između plodnijih i manje plodnih bikova za svaki ferment uspoređena je t-testom. U ejakulatima bikova s visokim non returnom (60-75%) signifikantno su više aktivnosti arginaze u sjemennoj plazmi i ekstraktima spermija ($P < 0,005$, $P < 0,005$), dok je aktivnost beta-glukuronidaze u sjemennoj plazmi bila signifikantno niža ($P < 0,005$) u bikova s visokim non returnom. Aktivnosti AST nisu se signifikantno razlikovale između navedenih skupina bikova.

Smatramo da određivanje aktivnosti arginaze i beta-glukuronidaze u sjemennoj plazmi i spermijima može biti dobar pokazatelj kvalitete ejakulata i sposobnosti spermija bikova za oplodnju.

Uvod

Posljednjih dvadesetak godina sve su češća istraživanja mijene tvari u ejakulatima sisavaca, te su mnogi autori utvrdili znatnu aktivnost u spermi domaćih rasplodnjaka. Na osnovi rezultata tih istraživanja, odnosno određivanjem aktivnosti enzima i razine drugih biološki aktivnih tvari mogu se dopuniti uobičajene makroskopske i mikroskopske ocjene ejakulata. Najveći broj istraživanja u tom smislu odnosi se na ejakulate bikova, jer se njihova sperma najčešće upotrebljava za umjetno osjemenjivanje. Ocjenom intenziteta aktivnosti enzima ili razine lipida, aminokiselina i drugih sastojaka sjemene

Dr Melita Herak, red. prof.; dr Miroslav Herak, red. prof., Veterinarski fakultet u Zagrebu; dr Božidar Premzl, mr Dubravko Viduč, Dubravka Dejanović, dipl. vet., Radoslav Mihajlović, dipl. vet., Centar za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske, Zagreb-Zavod Križevci.

plazme i spermija može se odrediti sposobnost ejakulata za duboko smrzavanje (konzerviranje spermija) kao i njihova sposobnost za oplodnju. Tako su Melita Herak i sur. (1990) dokazali da je u kvalitetnih bikova s visokim "non return" testom signifikantno viša razina ukupnih lipida, te vrlo jako signifikantno povećana razina kolesterina u spermijima i sjemenoj plazmi. Herak i sur. još su 1967. godine dokazali da je intenzitet aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST u daljnjem tekstu) u ejakulatima, a posebice u sjemenoj plazmi nerastova, u svezi sa sposobnošću oplodnje spermija iz ejakulata. Slične su rezultate dobili i drugi autori, pa je sigurno da će se nastaviti istraživanja s ciljem da se odrede biološki pokazivači svojstava najkvalitetnijih ejakulata bikova i ostalih rasplodnjaka, kao i sposobnost za konzerviranje ejakulata.

Pregled literature

Našim ranijim istraživanjima (Melita Herak i sur., 1985) dokazano je da se aktivnost beta-glukuronidaze u ejakulatima bikova mijenja s promjenama hormonaalnog statusa organizma rasplodnjaka gotovo u svakom mjesecu godine. Promjene tog enzima u sjemenoj plazmi i spermijima odvijaju se paralelno tijekom čitave godine.

Promjene aktivnosti enzima arginaze mijenjale su se također ovisno o sezoni godine i to paralelno s promjenama aktivnosti beta-glukuronidaze. U ekstraktu stanica spermija te su promjene bile slabo izražene i nesignifikantne, pa je očigledno aktivnost arginaze pretežno vezana uz funkcije stanica spermija. Svezu između aktivnosti beta-glukuronidaze i funkcije prostate u ljudi dokazao je Herrmann (1972). Melita Herak i sur. (1986) istražili su i promjene aktivnosti AST u ejakulatima bikova tijekom godine i našli da se mijenja svakog mjeseca u godini. Najviše aktivnosti AST zabilježene su od 6. do 9. mjeseca u sjemenoj plazmi, a najniže u stanicama spermija tijekom 5., 6., 7. i 8. mjeseca, u vrijeme kada je i kvaliteta spermija najlošija.

Navedeni rezultati ponukali su nas da istražimo povezanost između aktivnosti navedenih enzima (beta-glukuronidaza, AST, arginaza) u sjemenoj plazmi i ekstraktima spermija bikova s visokim i nižim "non return" testom.

Vlastiti rad

Tijekom posljednje dvije godine u Centru za u.o. Zavoda za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske u Križevcima uzimali smo povremeno uzorke ejakulata bikova, prilikom svakodnevnog polučivanja ejakulata za razrjeđivanje i pripremanje doza za umjetno osjemenjivanje. Ejakulati su potjecali od kvalitetnih bikova simentalke pasmine u dobi od dvije do sedam godina, jednako držanih i hranjenih. Prema uspjehu osjemenjivanja a na osnovi "non return" testa bikove smo podijelili na dvije skupine: s visokim "non returnom" od 60-75% i nižim od 50-60%.

Uzorak ejakulata poslije makroskopske i mikroskopske ocjene centrifugirali smo 10 min na 3000 okretaja. Na taj način odvojili smo sjemenu plazmu od stanica spermija i odlili je. Na sediment spermija dodana je redestilirana voda u količini koliko je bilo sjemene plazme, te je sadržaj promješan. Drugoga dana, nakon što su se raspale stanice spermija djelovanjem hipotonije, centrifugiranje je ponovljeno i na taj način odvojen je ekstrakt spermija. U sjemenoj plazmi i ekstraktu spermija određena je aktivnost

beta-glukuronidaze modificiranom metodom Fischmana (1955), aktivnost AST određena je pomoću originalnih test reagenicija tvrtke "Boehringer", a aktivnost arginaze po metodi Browna i Cohena (1960).

Aktivnost enzima izražena je u jedinicama na litru (U/L) u sjemenjnoj plazmi. Zbog razlike u koncentraciji spermija po mililitru aktivnost enzima u ekstraktima spermija preračunana je u jedinicama (U) na 1000,000.000 spermija (10^9).

Aktivnost sva tri enzima određena je u 39 ejakulata koji su potjecali od 18 bikova s "non returnom" od 50-60%, te u 41 ejakulatu što je potjecala od 25 bikova s „non returnom” od 60-75%.

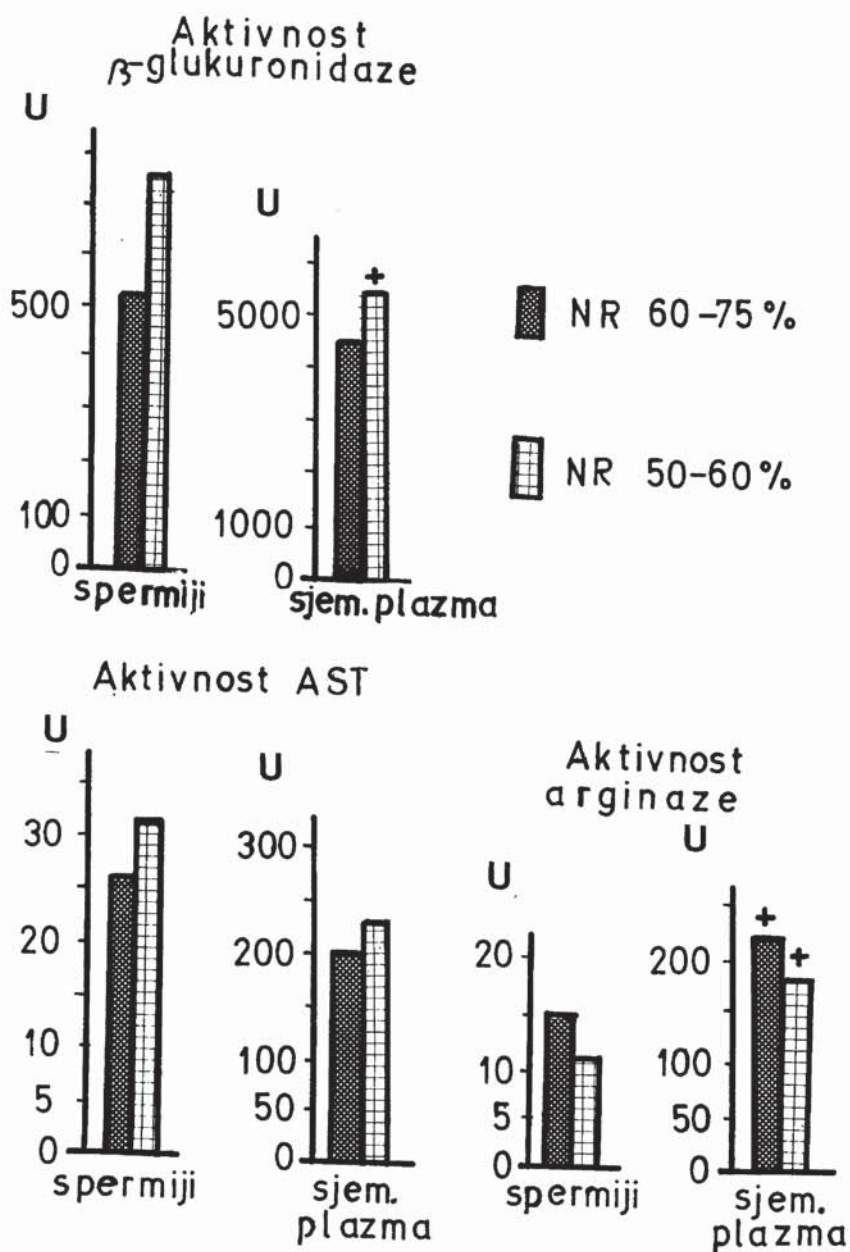
Rezultati određivanja aktivnosti enzima obrađeni su uobičajenim statističkim metodama kako je to opisao Petz (1970). Iz podataka određena je aritmetička sredina (M), minimalna i maksimalna aktivnost, standardna devijacija (s), standardna pogreška aritmetičke sredine ($s_{\bar{x}}$) i koeficijent varijabilnosti (Kv). Signifikantnost razlika u aktivnosti enzima uspoređena je između obje grupe t-testom po Studentu.

Rezultati i diskusija

Uspoređujući dobivene rezultate prema non returnu utvrdili smo da je aktivnost beta-glukuronidaze u spermijima bikova s nižim non returnom za oko 200 U niža nego u onih s višim non returnom, dok je u sjemenjnoj plazmi ta razlika još veća i iznosi oko 1000 jedinica. Razlika u aktivnosti u sjemenjnoj plazmi pokazala se vrlo signifikantnom ($P < 0,005$). Niža aktivnost beta-glukuronidaze u slabije plodnoj spermi (NR 50-60%) potvrđuje podatak da smo ranijim istraživanjima prateći promjene aktivnosti istog enzima u ejakulatima bikova tijekom godine našli signifikantno najniže vrijednosti tijekom ljeta (Melita Herak i sur. 1985) kada je kvaliteta ejakulata, kao i sposobnost spermija za oplodnju najniža. Isto tako je i Anwar (1977) u svojoj disertaciji dokazao da su ejakulati bikova s niskom aktivnošću beta-glukuronidaze najteže podnosili smrzavanje, jer je nakon otapanja bio prevelik broj mrtvih spermija. U svezi s navedenim saznanjima obavljani su pokušaji poboljšanja kvalitete i smrzljivosti ejakulata bikova dodavanjem beta-glukuronidaze (Dubravka Dejanović i sur., 1993).

Tab. 1 - PROMJENE AKTIVNOSTI ENZIMA U SPERMIJIMA I SJEMENOJ PLAZMI BIKOVA S NR 60-75%

	Beta-glukuronidaza		AST		Arginaza	
	sp	pl	sp	pl	sp	pl
N	41	41	41	41	41	41
M	572,04	4856,25	27,83	218,71	16,50	239,0
Min	210,0	1600,0	11,0	124,0	11,0	150,0
Max	1700,0	6200,0	65,0	375,0	28,0	330,0
s	399,61	1458,12	15,52	83,54	4,41	61,33
$s_{\bar{x}}$	81,57	297,63	3,24	17,44	0,90	12,54
Kv	69,86	35,95	55,83	38,21	28,76	25,66



+ $P < 0,005$

Nađene razlike u aktivnosti AST u sjemennoj plazmi i ekstraktima spermija bikova s višim i nižim non returnom nisu se pokazale signifikantnima, iako su u bikova s nižim non returnom aktivnosti bile više. Taj se podatak slaže s mišljenjem da je aktivnost AST u sjemennoj plazmi povezana s oštećenjem stanične membrane spermija, te iz stanica spermija AST ulazi u sjemenu plazmu. Jasno, da su već slabo oštećeni spermiji slabije sposobni za oplodnju u odnosu na neoštećene. Navedeno mišljenje potvrđuju i naša istraživanja promjena aktivnosti AST tijekom godine (Melita Herak i sur. 1985), kada smo u lipnju, srpnju i kolovozu našli najniže aktivnosti AST u stanicama spermija, a najvišu u sjemennoj plazmi i to u mjesecima kada je sposobnost spermija bikova za oplodnju najniža. Breeuwsma (1972) je također na osnovi "non return" metode ustanovio da bikovi s visokom plodnošću imaju visoku aktivnost AST u spermijima.

Krystina Swidowicz i Strzeżek (1986) utvrdili su naglo povećanje aktivnost AST poslije smrzavanja i otapanja spermija bikova, što potvrđuje da se navedeni enzimi oslobađaju u sjemenu plazmu poslije oštećenja spermija, što je u ovom slučaju bilo uzrokovano dubokim smrzavanjem. Poznato je da je AST bilokularni enzim tj. da je nađen i u citoplazmi i u mitohondrijima stanica spermija, pa je logično da mu se povećava aktivnost u izvanstaničnoj tekućini poslije oštećenja spermija. Izlazak AST u ekstracelularnu tekućinu mijenja svojim smanjenim djelovanjem u mitohondrijima stupanj oksidacione fosforilacije, koja je u svezi sa sintezom ATP-a neophodna za gibanje spermija, pa se i na taj način smanjuje sposobnost za oplodnju spermija.

Tab. 2. - PROMJENE AKTIVNOSTI ENZIMA U SPERMIJIMA I SJEMENOJ PLAZMI BIKOVA S NR 50-60%

	Beta-glukuronidaza		AST		Arginaza	
	sp	pl	sp	pl	sp	pl
N	39	39	39	39	39	39
M	784,34	5885,91	33,8	255,7	11,9	189,2
Min	250,0	2500,0	12,5	95,0	5,0	127,0
Max	2000,0	7200,0	152,9	360,0	20,0	310,0
s	587,30	1423,19	13,73	75,72	5,42	47,16
\bar{s}_x	142,45	345,17	3,33	18,36	1,31	11,43
Kv	74,88	27,98	40,63	29,61	45,61	24,92

Aktivnost arginaze u ekstraktima spermija i u sjemennoj plazmi bikova s visokim non returnom bila je vrlo signifikantno viša ($P < 0,005$, $P < 0,005$) u odnosu na spermije i sjemenu plazmu bikova s nižim non returnom. Aktivnosti arginaze u sjemennoj plazmi bile su u oba slučaja oko 15 puta više nego u spermijima iako je prosječna aktivnost u sjemennoj plazmi plodnijih bikova bila mnogo viša (239 U) nego u manje plodnih bikova (189,2). O važnosti arginaze i odnosu njezine aktivnosti s hormonalnom regulacijom ima malo podataka. Poznato je njeno djelovanje u funkciji jetre u svezi s ornitinskim ciklusom. Povećana aktivnost arginaze dokazana je u mliječnoj žlijezdi, testesima i bubregu, a injekcijama kortikosteroida može se inducirati sinteza tog

enzima (Berkeš i Tomašević-Berkeš, 1975).

Reyero i Dorner (1975) dokazali su da arginaza sudjeluje u sintezi prolina, glutaminske kiseline, putrescina te spermidina i spermina, što redovito nalazimo u ejakulatima ljudi i nekih sisavaca, a potječu iz akcesornih spolnih žlijezda, koje su pod hormonalnom kontrolom. Istraživanja aktivnosti arginaze u svezi sa spermatogenezom i kvalitetom sperme nastaviti ćemo i dalje.

Zaključci

Određivanje aktivnosti beta-glukuronidaze i arginaze u spermijima i sjemenoj plazmi bikova dobar su pokazatelj sposobnosti za oplodnju spermija u ejakulatu.

U ejakulatima bikova s nižim non returnom od 50-60% signifikantno su manje aktivnosti arginaze u spermijima i sjemenoj plazmi ($P < 0,005$, $P < 0,005$), a povećana je aktivnost beta-glukuronidaze u sjemenoj plazmi istih bikova.

Aktivnosti AST u spermijima i sjemenoj plazmi plodnijih bikova (NR 60-75%) bile su nesignifikantno niže, pa možemo zaključiti da je ipak manji postotak oštećenih spermija u ejakulatima bikova s niskim non returnom.

LITERATURA

1. Anwar M. (1977): Količina askorbinske kiseline, i aktivnost AP, GOT, te beta-glukuronidaze u ejakulatima bika upotrebljivim i neupotrebljivim za konzerviranje dubokim smržavanjem. Disertacija, Zagreb.
2. Berkeš J., Tomašević-Berkeš P. (1975): Opšta i medicinska enzimologija, Medicinska Knjiga, Zagreb.
3. Breeuwsma A.J. (1972): The interrelationship between seminal glutamic-oxalacetic transaminase and fertility in bulls. VII Inter. Congr. f. tiere. Fortpfl. und kunst. Besam Munchen 2129.
4. Brown G.W., Cohen P.P. (1960): Comparative biochemistry of urea synthesis, 3 activities of urea-cycle enzymes in various higher and lower vertebrates. Biochem. J., 75, 82.
5. Dejanović Dubravka, Herak Melita, M. Herak, Premzl B., Viduč D. i Dvojković K. (1993): Dodavanje beta-glukuronidaze u razrjeđivač za spermu bika koja služi za umjetno osjemenjivanje. Zbornik sažetaka radova "Veterinarska znanost i struka", znanstveno-stručni sastanak 24-25 lipnja 1993, 55.
6. Fischman W.H. (1955): Beta-glucuronidase. In Advances in Enzymology 361.
7. Herak M., Herak Melita, Lončarić J. (1967): Veränderungen der Transaminaseaktivität im Ebersperma und ihre Beziehung zur Beweglichkeit der Spermien. Fortpfl. Haust. Bd. 3, 238.
8. Herak Melita, Herak M., Premzl B., Dubravka Dejanović i Sukalić M. (1985): Promjene aktivnosti beta-glukuronidaze i arginaze u ejakulatima bikova. Veterinarski arhiv 55 (Suppl.), 38-40.
9. Herak Melita, Herak M., Premzl B., Gradinski-Vrbanac Bojana, Dejanović Dubravka (1986): Encimatske promjene u sjemenoj plazmi i spermijima bikova odabranih za umjetno osjemenjivanje. Zbornik radova III Jug. kongresa za razmnožavanje i uzgoj životinja. Umag 12-14. 3.1986., Vol.II, 481.
10. Herak Melita, Herak M., Premzl B., Gradinski-Vrbanac Bojana i Mihajlović R. (1990): Promjene količine nekih lipida u spermijima i sjemenoj plazmi bikova ovisne o njihovoj dobi i plodnosti. Stočarstvo, 44, 371-377.
11. Herrman W. P. (1972): Enzymatische Aktive Proteine im menschlichen Spermplasma. Beitr. Gerichtl. Med. 29, 175.
12. Petz B. (1964): Osnovne statističke metode. Škola narodnog zdravlja "Andrija Štampar" Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Zagreb.

13. Reyero Cristina, Dorner F. (1975): Purification of Arginases from Haman-Leukemic Lymphocytes and Granulocytes: Study of their Physiochemical and Kinetic Properties. J. Biochem. 56, 137-147.
14. Swidiwicz Krystina, Strzeżek J. (1986): Einfluss der Bullenalters und der Jahreszeit auf kryobiochemische Veränderungen der spermien Zuchthyg. 21, 241-256.

DIFFERENCES IN ACTIVITY OF ENZYMES BETA-GLUCURONIDASE, AST AND ARGINASE IN THE EJACULATES OF THE BULLS WITH THEIR FERTILITY

Summary

In 39 ejaculates of 18 bulls with the "non return" of 50-60%, and in 41 ejaculates of 25 bulls with the "non return" of 60-75%, the simenthal breed from the Center for artificial insemination, activity changes of enzymes beta-glucuronidase, AST and arginase were determined by using customary chemical methods, separately for sperm and seminal plasma. The total of 480 determination were performed. The results of the determination were statistically analyzed, for both groups of bulls and compared by T-test.

In the ejaculates of bulls with higher "non return" activities of arginase were significantly higher in the sperms and in the semen plasma ($P < 0,05$, $P < 0,05$) than in the ejaculates of bulls with "non return" of 50-60% . The activity of beta-glucuronidase in the semen plasma of bulls with higher "non return" was significantly lower than in the first group of bulls ($P < 0,05$). Differences of AST activities between both groups of bulls were nonsignificant. Determination of enzymatic activity of arginase and beta-glucuronidase in the semen plasma and sperms of bulls could be a very good indicator for the quality of ejaculate and fertilizing capacity of the sperm.

Primljeno: 25. 11. 1993.