

# Aktywność inhibitora trypsyny w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym

KAROLINA STASIAK, BOGDAN JANICKI

Katedra Biologii Małych Przeżuwaczy i Biochemii Środowiska Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt ATR,  
ul. Mazowiecka 28, 85-024 Bydgoszcz

Stasiak K., Janicki B.

## Activity of the trypsin inhibitor on the semen plasma of the polar fox *Alopex lagopus* L. during the reproductive season

### Summary

The aim of this work was to determine the activity of the akrosin inhibitor on the basis of depressing the trypsin activity of polar fox (*Alopex lagopus*) semen and to follow the changes that affect these properties throughout the whole reproductive season. Additionally, the molecular forms of the inhibitor were electrophoretically separated. The research covered 126 ejaculates obtained manually seven times from 18 polar foxes (at intervals of 10-12 days). The highest inhibitor activity was observed in the seminal plasma from the ejaculates obtained in the first sample, the lowest results were characteristic of the fifth sample. The lowest activity of the akrosin inhibitor, determined on the basis of depressing the trypsin activity, indicates either the weakest protection of the semen proteins along with the whole reproductive system from the influence of the akrosin devoid of damaged acrosomes or the already initiated process of proteolysis.

**Keywords:** fox, *Alopex lagopus*, seminal plasma, trypsin inhibitor

U różnych gatunków zwierząt miejscem bogatym w enzymy umożliwiające interakcję gamet w czasie zapłodnienia jest akrosom plemnika. To właśnie w nim stwierdzono obecność proteinaz serynowych, tiolowych, arylowych, karboksylowych oraz metaloproteinaz (3). Wiele z nich bierze również udział w procesie regulacji ruchu plemników, jak również w degradacji starzejących się plemników w najądrzach (6, 14). Najbardziej poznanym, a zarazem najważniejszym enzymem branym pod uwagę przy ocenie jakości nasienia należącym do proteinaz serynowych – enzymów proteolitycznych mających w swym centrum aktywnym serynę, jest akrosyna (12). Ten trypsynopodobny, związany z błoną wewnętrzną akrosomu plemnika enzym bierze bezpośredni udział w procesie zapłodnienia ssaków, poprzez katalizowanie reakcji hydrolytycznego rozpadu osłonki przejrzystej komórki jajowej (11) oraz uczestniczy w dyspersji *matrix* akrosomu i przyłączenia plemników do *zona pellucidda* (12). Istotną rolę w regulacji aktywności akrosyny pełnią obecne w plazmie nasienia inhibitory tego enzymu (8), zaadsorbowane na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej plemników. Inhibitory te (dzięki posiadanej dużej zdolności wiązania się z akrosyną lub trypsyną) są naturalnymi antagonistami akrosyny. Główną funkcją inhibitorów akrosyny jest ochrona białek nasienia i tkanek układu rozrodczego przed proteolitycznym i immunogennym działaniem tego enzymu, uwal-

nianego z uszkodzonych lub obumarłych plemników (11). W takich przypadkach uwalniana akrosyna jest trwale wiązana przez te inhibitory. Ich zawartość w plazmie nasienia uzależniona jest od gatunku, a nawet od wieku zwierząt (10). Według Torskiej (12), w ejakulowanych plemnikach człowieka, knura czy tryka molowa zawartość inhibitorów odpowiada molarnej zawartości akrosyny.

W nienaruszonym akrosomie, akrosyna wraz z naturalnymi inhibitorami oraz z formą zymogenową, tzw. proakrosyną, stanowi system akrosynowy plemników (4). W plemnikach ejakulowanych prawie cała akrosyna występuje w formie nieaktywnej. Dopiero po uszkodzeniu akrosomu czy to w czasie reakcji akrosomowej, czy też pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska proakrosyna aktywowana jest do akrosyny (3). Dlatego też odpowiednia zawartość proakrosyny i akrosyny w plemnikach jest wskaźnikiem stabilności akrosomów i może być wykorzystana jako biochemiczny test w ocenie jakości nasienia konserwowanego (1).

W dostępnej literaturze wiadomości o pozostałych proteinazach obecnych w akrosomie plemnika są przedstawiane w sposób fragmentaryczny. Do mniej poznanych proteinaz o specyficzności trypsynowej można zaliczyć wykryty w plemnikach człowieka system sperminogen-spermina czy w plemnikach buhaja inhibinę. SH-proteinazę zaliczaną do grupy proteinaz

tiolowych wyizolowano z plemników większości gatunków zwierząt hodowlanych. Natomiast proteiny karboksylowe zwane inaczej kwaśnymi poznano dzięki wyizolowanej z jąder królika proakrozyminy (3).

Celem badań było określenie: a) aktywności inhibitora akrosyny w plazmie nasienia lisa polarnego na podstawie hamowania aktywności trypsyny oraz prześledzenie zmian, jakim ten parametr podlega w okresie sezonu reprodukcyjnego, b) form molekularnych inhibitora trypsyny.

### Materiał i metody

Materiałem badawczym było nasienie pobrane siedmiokrotnie od osiemnastu lisów polarnych *Alopex lagopus L.* pochodzących z fermy zwierząt futerkowych w Łachowie k. Szubina w województwie kujawsko-pomorskim. Próbkę nasienia pozyskiwano od samców metodą manualną przez cały okres wzmożonej aktywności płciowej, tj. od połowy lutego do połowy kwietnia 2003 roku, w odstępach 10-12-dniowych, uzyskując ogółem 126 ejakulatów. Po odwirowaniu plemników z ejakulatów (10 minut przy  $8000 \times g$ ) pozyskano plazmę nasienia, w której oznaczono aktywność inhibitorów akrosyny na podstawie hamowania aktywności trypsyny, a także wykonano profile elektroforetyczne form molekularnych inhibitora. Powyższe badania wykonano w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

Oznaczanie spektrofotometryczne inhibitora znajdującego się w plazmie nasienia wykonano w kuwetach polistyrenowych, za pomocą spektrofotometru firmy Beckman (lampa vis, faktor 980,50). W tym celu sporządzono taki roztwór trypsyny, w którym aktywność tego enzymu wynosiła około 36-40 U/l (ok. 6 mg trypsyny wołowej rozpuszczono w  $300 \text{ cm}^3$  buforu Tris-HCl o stężeniu 0,05 molowym i pH 8,2). Podczas oznaczania aktywności sporządzony roztwór przechowywano w lodzie. Po kalibracji aparatu przystąpiono do oznaczenia inhibitora w badanych próbkach. W tym celu plazmę lisów polarnych rozcieńczono  $200 \times$  buforem Tris-HCl. Dalszy sposób przygotowania próbek został przedstawiony w tab. 1. Po 5-minutowej inkubacji próbek (temp.  $25^\circ\text{C}$ ) w spektrofotometrze do każdej z kuwet dodano po  $0,1 \text{ cm}^3$  roztworu BAPNA (do  $0,0217 \text{ g}$  BAPNA dodano  $2,5 \text{ cm}^3$  DMSO, a po rozpuszczeniu  $7,5 \text{ cm}^3$  buforu Tris-HCl), wymieszano ich zawartość i dokonano pomiaru przy długości fali 410 nm co 1 minutę przez 5 minut. Zebrane wyniki aktywności po podstawieniu do wzoru: (aktywność wzorcowa – aktywność inhibitorowa próbki)  $\times$  rozcieńczenie plazmy przedstawione były w postaci U/l.

Tab. 1. Przygotowanie próbek do oznaczenia

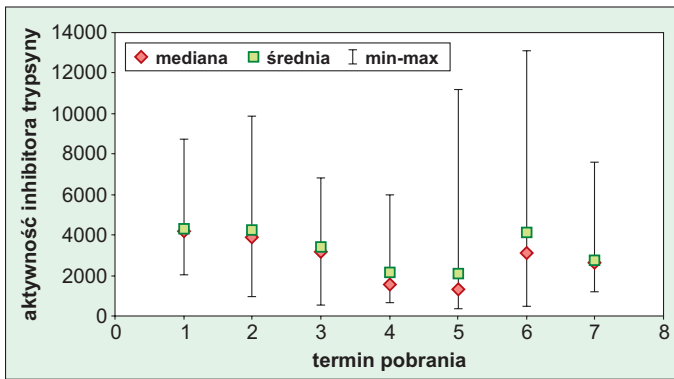
Odczynnik	Wzorzec ( $\text{cm}^3$ )	Badana próbka ( $\text{cm}^3$ )
Bufor z albuminą (do $0,083 \text{ g}$ albuminy wołowej dodano $50 \text{ cm}^3$ buforu Tris-HCl)	0,30	0,25
$\text{CaCl}_2$ (0,2 M roztwór chlorku wapnia rozpuszczony w buforze Tris-HCl)	0,05	0,05
Roztwór trypsyny wołowej	0,05	0,05
Plazma (odpowiednio rozcieńczona)	-	0,05

Elektroforetyczne wykrywanie aktywności inhibitorów trypsyny przeprowadzono na żelach poliakrylamidowych o różnej gęstości, zgodnie z metodyką opracowaną przez Laemmli'ego (7), z zastosowaniem aparatu do elektroforezy pionowej Mighty Small II firmy Amersham Pharmacia Biotech. (Szwecja). Rozdzielenia białek dokonano dwoma różnymi sposobami: za pomocą elektroforezy niedenaturującej, zwaną inaczej natywną i denaturującej (z dodatkiem dodecylu siarczanu sodu – SDS).

Elektroforeza natywna (bez dodatku SDS) pozwala rozdzielić białka ze względu na gęstość ich ładunku. Brak detergentu w postaci SDS powoduje utrzymanie białka w stanie niezdenaturowanym. Rozdziały elektroforetyczne przeprowadzono na 10% żelach poliakrylamidowych. Przed elektroforezą próbki plazmy nasienia mieszano z buforem obciążającym w stosunku 1 : 1. Na żel nanoszono po  $21 \mu\text{l}$  próby. Rozdziały przeprowadzono w buforze Tris-glicyna o pH 8,3 przy 20 mA i 200 V przez 85 minut. Po zakończeniu elektroforezy żele inkubowano w roztworze trypsyny wołowej (1,5 mg trypsyny wołowej w  $25 \text{ cm}^3$  0,1 molowego buforu fosforanowego pH 7,4/1 żel) przez 15 minut w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Następnie zlano roztwór trypsyny, a żele zalano mieszaniną barwiącą (13).

Masy molekularne rozdzielonych białek oznaczono metodą elektroforezy denaturującej (SDS-PAGE). Rozdziały przeprowadzono na 12,5% żelach poliakrylamidowych z dodatkiem SDS, dzięki któremu białka w plazmie nasienia zostają rozbite na podjednostki – łańcuchy polipeptydowe. Przed elektroforezą próby plazm nasienia rozcieńczono roztworem soli fizjologicznej w stosunku 1 : 3, a następnie uzyskany roztwór zmieszano z buforem do przygotowania prób z dodatkiem SDS i DTT (ditiotreitól) w stosunku 1 : 1. Z przygotowanej mieszaniny pobrano  $0,005 \text{ cm}^3$  i naniesiono do odpowiednich studzienek w żelu. Równolegle naniesiono mieszaninę standardów firmy Bio-Rad: fosforylaza B (110,0 kDa), albumina surowicy wołowej (90,0 kDa), albumina jaja kurzego (51,2 kDa), anhydraza węglanowa (36,2 kDa), sojowy inhibitor trypsyny (29,0 kDa) i lizozym (21,4 kDa). Rozdział elektroforetyczny białek plazmy nasienia przeprowadzono przy stałym natężeniu 40 mA i napięciu o wartości 200 V. Po zakończeniu elektroforezy (około 90 minut) żele umieszczono w  $100 \text{ cm}^3$  roztworu barwiącego, na 18 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie nadmiar barwnika wypłukano z żelu rozpuszczalnikiem o składzie woda : metanol : kwas octowy w proporcji 8 : 2 : 1, do uzyskania bezbarwnego tła. Z tak przygotowanego elektroforogramu, na podstawie mas molekularnych wzorców, wyznaczono masy cząsteczkowe rozdzielonych frakcji białkowych. Masy molekularne frakcji białkowych były oceniane przy użyciu programu Kodak 1D (Eastman Kodak company, New Haven, USA).

Uzyskane wyniki aktywności inhibitora nie spełniały założeń o normalności rozkładu i jednorodności wariancji, dlatego szacowanie statystycznej istotności oddziaływania terminu pobrania nasienia na wartości aktywności wykonano z wykorzystaniem nieparametrycznej jednoczynnikowej analizy wariancji (test Kruskala-Wallisa). Obliczenia statystyczne uzyskanych wyników wykonano przy pomocy programu Statistica 5.0 oraz Microsoft Excel 2003.

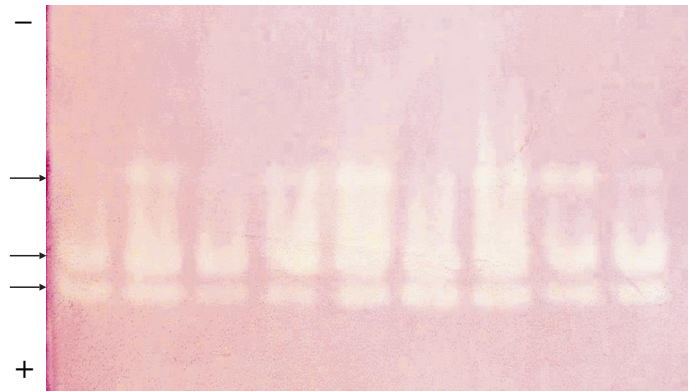


Ryc.1 Aktywność inhibitora trypsyny w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym [U/l]

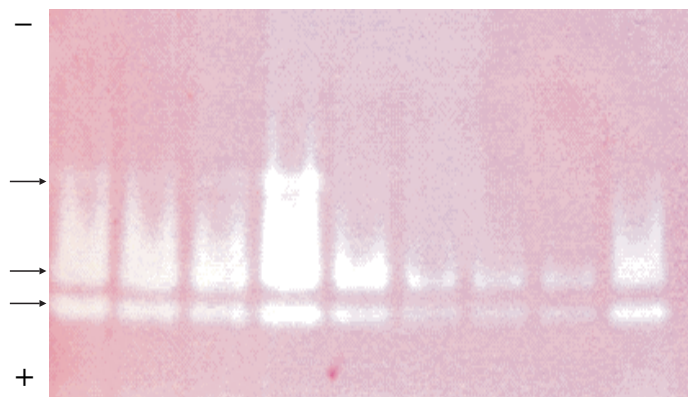
### Wyniki i omówienie

Oznaczona w plazmie nasienia lisa polarnego, średnia aktywność inhibitora trypsyny dla całego sezonu rozrodczego wynosiła 3305,71 U/l. Najwyższą aktywność inhibitora stwierdzono w plazmie nasienia z ejakulatów uzyskanych podczas pierwszego pobrania 4296,48 U/l, natomiast najniższą charakteryzowały się próby pozyskane w pobraniu piątym 2089,83 U/l (ryc. 1). Uzyskane wartości aktywności inhibitora trypsyny różniły się statystycznie istotnie (przy  $p \leq 0,001$ ) w zależności od terminu pobrania, co potwierdził zastosowany test nieparametryczny. Najbardziej niekorzystnym wydaje się pobranie piąte, gdzie oznaczona aktywność inhibitora jest najniższa, co z kolei świadczy o najsłabszej ochronie białek nasienia i całego układu rozrodczego przed działaniem uwolnionej z uszkodzonych akrosomów – akrosyny lub o rozpoczętej już proteolizie. Uzyskane wartości aktywności inhibitora trypsyny skorelowano z innymi parametrami biochemicznymi. Dzięki wyznaczonym zależnościom oraz uzyskanym dodatnim i statystycznie istotnym współczynnikom korelacji z koncentracją plemników ( $r = 0,65$ , przy  $p \leq 0,01$ ), z aktywnością fosfatazy alkalicznej ( $r = 0,81$ , przy  $p \leq 0,01$ ) i kwaśnej ( $r = 0,65$ , przy  $p \leq 0,01$ ) można stwierdzić, że za pochodzenie tych inhibitorów odpowiedzialne są najadźrza. Z kolei wyznaczony współczynnik korelacji między aktywnością inhibitora a zawartością białka ogólnego w plazmie nasienia ( $r = 0,36$ , przy  $p \leq 0,01$ ) sugeruje ochronę plemników przed proteolizą podczas przebywania ich w nasieniowodach (2).

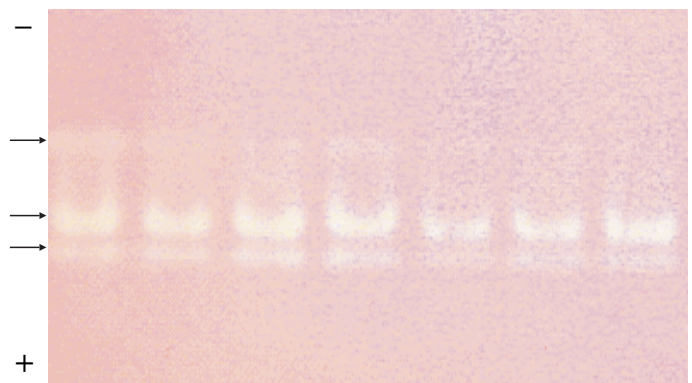
Przeprowadzona elektroforeza natywna (bez środków denaturujących) wykazała w plazmie nasienia obecność trzech, różniących się tempem migracji, molekularnych form inhibitora trypsyny (5). Na ryc. 2 przedstawiono białka o aktywności inhibitora w plazmie nasienia pochodzącej od dziewięciu losowo wybranych lisów podczas pierwszego pobrania. We wszystkich próbach wykryto trzy różne formy tego inhibitora, spośród których tylko druga forma, o średnim tempie migracji, stanowiła szerokie pasmo. Podobnej ocenie poddano plazmę nasienia pozyskaną od dziewięciu tych samych lisów podczas ostatniego –



Ryc. 2. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od losowo wybranych lisów – pobranie pierwsze)

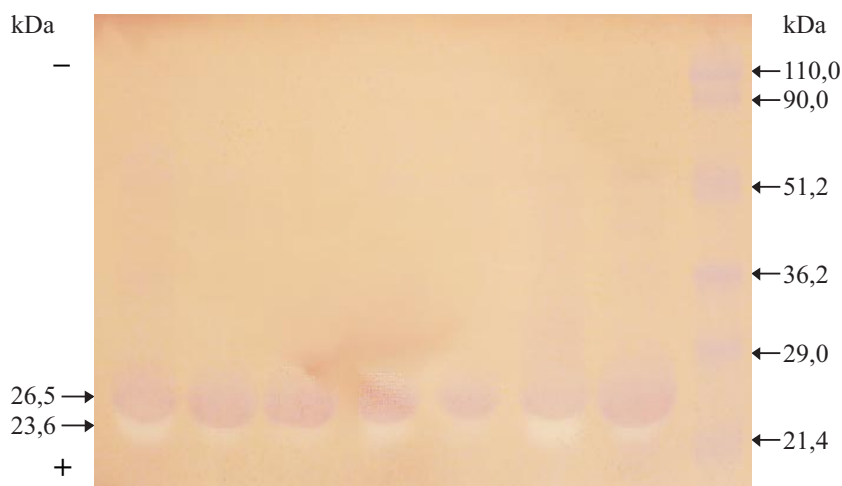


Ryc. 3. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od losowo wybranych lisów – pobranie siódme)



Ryc. 4. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące losowo wybranego osobnika przez wszystkie siedem pobrań)

siódmego pobrania (ryc. 3). Badane plazmy charakteryzowały się obecnością form molekularnych inhibitora trypsyny o największym i średnim tempie migracji. W niektórych tylko przypadkach pojawiła się dodatkowo trzecia forma tego inhibitora. Najbardziej intensywnym, a zarazem najszerszym pasmem okazała się, podobnie jak to było w pobraniu pierwszym, forma o średnim tempie migracji. Porównując plazmę



Ryc. 5. Profil elektroforetyczny inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy SDS-PAGE (plazmy pochodzące od jednego osobnika przez wszystkie siedem pobrań)

pozyskaną w dwóch pobraniach pod kątem obecności różnych form molekularnych inhibitora wyraźnie zauważa się zanik jednej z nich. W celu stwierdzenia, od którego pobrania następuje zanik tej formy, wykonano obrazy elektroforetyczne aktywności inhibitora dla jednego osobnika przez wszystkie siedem pobrań (ryc. 4). Z uzyskanego elektroforogramu wynika, że trzy formy pojawiają się w plazmie zawsze na początku sezonu rozrodczego. W późniejszych pobraniach można stwierdzić zanik formy inhibitora o najwolniejszym tempie migracji.

W celu oszacowania masy molekularnej inhibitora w plazmie nasienia lisów polarnych zastosowano elektroforezę denaturującą (SDS-PAGE). Użytym markerem była mieszanina sześciu wzorców o różnych masach molekularnych (110,0÷21,4 kDa). Na ryc. 5 przedstawiono rozdzielanie elektroforetyczne białek w plazmie nasienia pochodzącej od jednego osobnika przez wszystkie siedem pobrań. W wyniku rozdzielania we wszystkich przypadkach uzyskano dwa, różniące się zabarwieniem pasma. W postaci ciemniejszych pasm widoczne jest białko o aktywności esterazy (26,5 kDa), natomiast jaśniejsze prążki wykazywały cechy proteiny serynowej (23,6 kDa). Masa cząsteczkowa tego pasma podobna była do masy trypsyny, która w organizmach ssaków aktywuje i degradowuje inne enzymy (9, 14).

### Podsumowanie

W dostępnym piśmiennictwie niewiele uwagi poświęca się aktywności i formom molekularnym inhibitora trypsyny obecnego w plazmie nasienia lisa polarnego, dlatego tym cenniejsze wydają się wyniki uzyskane w badaniach własnych. Autorzy wykazali w badaniach elektroforetycznych obecność trzech form inhibitora o różnym tempie migracji w polu elektrycznym. Pod koniec sezonu reprodukcyjnego obok wyraźnego obniżenia aktywności tego białka stwierdzić można spadek, a czasami wręcz zanik formy inhibi-

tora o najwolniejszym tempie migracji. Te białka inhibitorowe, syntetyzowane głównie w najdłuższych odpowiadają za blokowanie aktywności wolnej akrosyny, która jako enzym proteolityczny może prowadzić do destrukcji plemników w męskim układzie rozrodczym.

Dzięki prowadzonej kontroli aktywności inhibitora akrosyny (oznaczonego na podstawie hamowania aktywności trypsyny), można w dowolnym momencie sezonu rozrodczego ocenić jakość pobranego nasienia. Uzyskane wówczas wyniki stają się bardzo przydatne w praktyce, gdyż każdego hodowcę interesuje nasienie o wysokiej wartości hodowlanej, na którą składa się, między innymi, wysoka aktywność inhibitora w plazmie nasienia.

### Piśmiennictwo

- Borkowski K., Strzeżek J.: Wykorzystanie wskaźników biochemicznych do oceny jakości nasienia tryka. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 200-202.
- Cierieszko A., Piros B., Dąbrowski K., Kucharczyk D., Łuczyński M. J., Dobosz S., Glogowski J.: Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. *J. Fish Biol.* 1998, 53, 1292-1305.
- Čechova D.: Enzymy proteolityczne w akrosomie plemnika. Materiały letniej szkoły młodych pracowników nauki nt. Fizjologiczne, biochemiczne i immunologiczne zagadnienia męskiego układu rozrodczego oraz nasienia. *Biul. Infor. ART, Olsztyn* 1988, nr 25, 97-104.
- Glogowski J., Falkowski J., Rotkiewicz T.: Aktywność fosfataz w plazmie nasienia knurow w cyklu rocznym i ich związek z podstawowymi wyznacznikami jakościowymi ejakulatów. *Rocz. Nauk. Zoot.* 1997, 24, 85-95.
- Kotłowska M., Kowalski R., Glogowski J., Jankowski J., Cierieszko A.: Gelatinases and serine proteinase inhibitors of seminal plasma and the reproductive tract of turkey (*Meleagris gallopavo*). *Theriogenology* 2005, 63, 1667-1681.
- Kowalski R., Wojtczak M., Glogowski J., Cierieszko A.: Gelatinolytic and anti-trypsin activities in seminal plasma of common carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa. *Aquat. Living Resour.* 2003, 16, 438-444.
- Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Lee C., Keefer M., Zhao Z. W., Kroes R., Berg L., Liu X. X., Sensibar J.: Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by two-dimensional electrophoresis. *J. Andrology* 1989, 10, 432-438.
- Paju A., Bjartel A., Hang W.-M., Nordling S., Borgstrom A., Hansson J., Stenman U.-H.: Expression and characterization of trypsinogen produced in the human male genital tract. *Amer. J. Pathol.* 2000, 157, 2011-2020.
- Strzeżek J.: Wybrane układy enzymatyczne nasienia zwierząt gospodarskich w aspekcie doskonalenia jego konserwacji i płodności samców. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol.* 1987, 340, 9-40.
- Śmigielka J., Strzeżek J.: Aktywność inhibitorów akrosyny w plazmie nasienia buhaja jako wskaźnik oceny stanu błon akrosomu. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol.* 1986, 263, 185-197.
- Torska J.: Właściwości wysokocząsteczkowych inhibitorów proteinaz z plazmy nasienia buhaja. *Zesz. Nauk. ART Olsztyn. Zootechnika* 1989, 351, supl. D.
- Uriel J., Berges J.: Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature* 1968, 218, 578-580.
- Wojtczak M., Glogowski J., Koldras M., Kucharczyk D., Cierieszko A.: Characterization of protease inhibitors of seminal plasma of cyprinids. *Aquat. Living Resour.* 2003, 16, 461-465.

Adres autora: dr inż. Karolina Stasiak, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: szynder@atr.bydgoszcz.pl