

ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ І ГІДРОПЕРЕКИСІВ ЛІПІДІВ ТА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ГОМОГЕНАТАХ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ САМИЦЬ ЩУРІВ ПРИ СТИМУЛЯЦІЇ ЕМБРІОНАЛЬНО-МАТКОВОГО СИГНАЛУ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ СЕЛЕНВМІСНОГО ПРЕПАРАТА

С. В. Федорова, І. І. Гевкан, О. В. Штапенко, Ю. І. Сливчук

Встановлено підвищення антиоксидантних процесів під впливом нового селеновмісного препарату пролонгованої дії з депонуючою речовиною для стимуляції статевого циклу у самиць щурів та посилення у них формування ембріонально-маткових взаємодій на ранніх стадіях вагітності. При визначенні рівня заплідненості після застосування нового селеновмісного препарату виявлено, що індекс вагітності був найвищим у групі тварин з підвищеним трьохразовим введенням препарату селену до запліднення. При цьому встановлено, що в матці і серці тварин цієї групи зростає вміст продуктів перекисного окислення ліпідів. Також запропонована схема введення препарату підвищує активність фермента глутатіонпероксидази порівняно з контролем, що вказує на активацію обмінних процесів взагалі та антиоксидантних зокрема.

Однією з причин порушення ембріогенезу та репродуктивної функції може бути дефіцит селену у раціоні тварин [3, 4]. Порушення функцій окремих органів і систем організму в цілому при низькому вмісті в ньому селену обумовлені тим, що на клітинному рівні даний мікроелемент відіграє ключову роль у підтримці цілісності клітинних мембран, формує активні центри таких ферментів, як глутатіонпероксидаза, гліцинредуктаза, форміатдегідрогеназа, перешкоджає накопиченню внутрішньоклітинного кальцію, приймає участь у метаболізмі амінокислот та кетокислот, а також цілого ряду енергопродукуючих перетворень [1, 2]. Згадані дані вказують про участь селену в першій і другій фазі біохімічної адаптації: окисленні чужорідних речовин з утворенням органічних окисів та перекисів, зв'язування та виведення активних метаболітів [10].

Посилення обмінних процесів, які відбуваються в організмі під час статевої охоти, заплідненні та імплантації ембріонів супроводжується накопиченням активних форм кисню та інших перексидантів, що може викликати оксидативний стрес та ускладнювати перебіг фізіологічних процесів [9]. Для профілактики таких ускладнень, доцільно додатково вводити в організм селеновмісні препарати. Саме тому, метою нашої роботи було дослідження впливу введення селеновмісного препарату на антиоксидантні процеси на ранніх стадіях вагітності під час імплантації ембріонів. Відомо, що важливою складовою адаптивних перебудов є показники агрегатного стану крові, імунного статусу, ендокринної системи, а також перекисного окиснення ліпідів [5]. Від збалансованої взаємодії цих факторів у відповідь на регулюючий вплив гіпоталамуса залежить якість адаптації організму [6]. Адаптація організму під час вагітності, аналогічно як при фізіологічному стресі, посилює антиоксидантні відповіді організму, що зумовлює мобілізацію організму і попереджає розвиток окисного стресу [7].

У період вагітності помірна активація ПОЛ збільшує активність антиоксидантних ферментів забезпечуючи баланс ПОЛ-АОА, який необхідний для сприйняття ембріонально-маткового сигналу і формування адекватної відповіді із суперкомпенсаторними компонентами, що активізує енергетичний аеробний обмін і модифікує фізіологічний стан організму, переводячи його на вищий рівень [8]. Одним із параметрів, які дозволяють оцінити стан вільно радикальних процесів є вміст гідроперекисів ліпідів та ТБК-активних продуктів.

Матеріали і методи

В експерименті використано 15 лабораторних щурів лінії «Вістар» віком 6–7 місяців, які утримувались на стандартному раціоні. Вміст селену у раціоні не досліджувався, але ми вважали, що комбікорм був повноцінний і збалансований по всіх макро- і мікроелементах. Було сформовано 3 групи тварин по 5 голів в кожній. Перша дослідна група отримувала підшкірно селенвмісний препарат 3 рази (до запліднення), друга — 5 разів (до 3 рази і 2 після запліднення), третя група — контрольна. Препарат складався з селеніту натрію в дозі 15 мкг на щура, депонуючої речовини — розчину крохмалю в об'ємі 1 см³. Тварин було забито на 9-й день вагітності та відібрано зразки паренхіматозних і репродуктивних органів: яєчників, матки, серця, селезінки, наднирників, м'язів, нирок та печінки. Зразки тканин було заморожено в рідкому азоті. Рівень запліднюваності щурів вираховували за формулою: кількість спарованих/кількість запліднених x 100 %.

З заморожених тканин було відібрано зразки паренхіматозних та репродуктивних органів, які гомогензували у рідкому азоті для визначення вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів – гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів та рівня активності глутатіонпероксидази за загальноприйнятими методиками. Вміст гідроперекисів ліпідів визначали після осадження білків розчином трихлороцтової кислоти та екстракцією ліпідів етанолом з наступною взаємодією досліджуваних екстрактів з тіоціанатом амонію. Вміст гідроперекисів визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda=480$ нм. Контрольну пробу обробляли як дослідну, вміст гідроперекисів визначали за формулою: ΔD (гідроперекисів ліпідів) = D_{480} (дослід) – D_{480} (контроль).

Вміст малонового діальдегіду визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою, яка за високої температури в кислому середовищі протікає з утворенням кольорового комплексу. Вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda=535$ і $\lambda=580$ нм. Глутатіонпероксидазну активність визначали за методом Моїна В.М. (1986), де мірою активності ферменту є швидкість окислення глутатіону у приступності гідроперекису третинного бутілу. Статистичну обробку результатів досліджень проводили стандартними параметричними методами. Схема досліджень представлена в табл. 1.

Таблиця 1

Схема досліджень по застосуванню препарату селену на ранніх стадіях вагітності у лабораторних щурів при стимуляції статевої охоти у щурів за стандартною схемою ФСГ з хоріогонічним гормоном

Групи тварин	Гормональна обробка тварин		Підсадка самців (2 самця на 5 самок)	Введення селенвмісного препарату	
	Введення препарату ФСГ	Введення препа-рату хоріогоніч-ного гормону через 48 год після введення ФСГ		До запліднення	Після запліднення
Контрольна	20 МО на 1 самицю	30 МО на 1 самицю	Через 3 години після введення ХГЧ	-	-
Дослідна 1	20 МО на 1 самицю	30 МО на 1 самицю	Через 3 години після введення ХГЧ	3 рази	-
Дослідна 2	20 МО на 1 самицю	30 МО на 1 самицю	Через 3 години після введення ХГЧ	3 рази	2 рази

Результати й обговорення

При дослідженні рівня запліднення встановлено, що індекс вагітності у контрольній групі складав 80 %, у першій дослідній 100 %, у другій дослідній групі — 40 %.

У першій дослідній групі, де індекс вагітності був вищий, в окремих тканинах достовірно зростає вміст як гідроперекисів так і ТБК-активних продуктів. Так, в матці вміст гідроперекисів збільшується з $5,98 \pm 0,29$ в контролі до $8,31 \pm 1,72$ одЕ/г, а в серці з $4,37 \pm 0,41$ до $5,23 \pm 0,09$ одЕ/г

відповідно. Вміст малонового діальдегіду зростає в матці з $10,83 \pm 0,28$ в контролі до $21,69 \pm 1,8$ мкМ/г і в серці з $22,11 \pm 0,71$ до $33,89 \pm 1,52$ мкМ/г відповідно. У тварин другої дослідної групи спостерігається одночасне зниження вмісту як гідроперекисів так і малонового діальдегіду та зниження при цьому індексу вагітності.

Моніторинг протікання процесів перекисного окиснення ліпідів показав, що у матці і печінці груп тварин з високим індексом вагітності (у контрольній та 1-й дослідній групі, яка отримувала підшкірно селенвмісний препарат 3 рази до запліднення, спостерігається найвищий рівень гідроперекисів ліпідів. Причому, у 1-й дослідній групі рівень гідроперекисів ліпідів зростає і в наднирниках, що очевидно пов'язано з підвищенням функціональної активності наднирників та посиленого синтезу стероїдних гормонів при вагітності (табл. 2). В 2-й дослідній групі, тваринам якої вводили підшкірно селенвмісний препарат 5 разів (до запліднення 3 рази і 2 рази після запліднення) найвищий рівень гідроперекисів ліпідів був у матці, але в цифровому значенні вміст гідроперекисів був в 2,6 разів нижчим ніж у 1-ї дослідної і в 1,9 рази нижче у порівнянні з контрольною групою. Це вказує на гальмування надмірною кількістю селена проміжної ланки пероксидних процесів, що веде до утворення гідроперекисів.

Таблиця 2

Вміст ТБК-активних продуктів та гідроперекисів ліпідів у гомогенатах внутрішніх органів самиць щурів на ранніх стадіях вагітності за умов введення селенвмісного препарату ($M \pm n$)

Групи тварин	Тканини							
	Яєчники	Матка	Серце	Селезінка	Наднирники	М'язи	Печінка	Нирки
<i>ТБК-активний продукт (мкМоль/мл)</i>								
Контроль	$7,22 \pm 0,23$	$10,83 \pm 0,28$	$22,11 \pm 0,71$	$16,77 \pm 0,24$	$10,44 \pm 0,21$	$28,67 \pm 0,4$	$16,08 \pm 0,79$	$27,59 \pm 0,53$
Дослідна 1	$11,23 \pm 0,4^{**}$	$21,69 \pm 1,8^{**}$	$33,89 \pm 1,52^{**}$	$18,84 \pm 0,18^{**}$	$10,96 \pm 0,28$	$38,06 \pm 0,07^{**}$	$20,53 \pm 0,38^{**}$	$33,05 \pm 0,13^{**}$
Дослідна 2	$6,04 \pm 0,16^{**}$	$10,04 \pm 0,25$	$8,34 \pm 0,25^{***}$	$8,34 \pm 0,25^{***}$	$5,19 \pm 0,31^{**}$	$20,59 \pm 1,98^{**}$	$11,59 \pm 1,79$	$20,56 \pm 1,29^{**}$
<i>Гідроперекиси ліпідів (одЕ/г)</i>								
Контроль	$2,27 \pm 0,28$	$5,98 \pm 0,29$	$4,37 \pm 0,41$	$3,12 \pm 0,14$	$3,23 \pm 0,12$	$3,84 \pm 0,3$	$6,29 \pm 0,26$	$3,8 \pm 0,51$
Дослідна 1	$3,02 \pm 0,15^*$	$8,31 \pm 1,72$	$5,23 \pm 0,09$	$4,26 \pm 0,16^{**}$	$7,86 \pm 1,02^{**}$	$4,62 \pm 0,5$	$7,44 \pm 0,29^{**}$	$5,46 \pm 0,26^{**}$
Дослідна 2	$1,3 \pm 0,12^{**}$	$3,09 \pm 0,046^{**}$	$2,01 \pm 0,71^{**}$	$2,46 \pm 0,47$	$1,998 \pm 0,48^*$	$3,23 \pm 0,24$	$1,38 \pm 0,28^{**}$	$2,89 \pm 0,23$

При аналізі вмісту продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою і характеризують кінцеві стадії пероксидних процесів, ми спостерігали зниження їх вмісту в яєчниках та матці у всіх групах тварин, що може вказувати на позитивний вплив селену на антиоксидантний статус при становленні вагітності, але одночасно при цьому зростає вміст ТБК-активних продуктів у м'язах та нирках, що очевидно, можна пояснити стресом, який зазнає організм на ранніх стадіях вагітності [8]. Особливо це видно в групах тварин, де індекс вагітності є високим – в контрольній та 1-й дослідній групі. Підвищення рівня ТБК-активних продуктів відображає активацію пероксидних процесів.

У результаті проведених досліджень найвищий рівень активності глутатіонпероксидази в різних органах ми спостерігали в матці у всіх групах тварин, при цьому цифрове значення найбільш виражене є у 1-й дослідній — $16,92 \pm 0,04$ (індекс вагітності 100 %), а найменше у 2-й дослідній групі — $14,7 \pm 0,23$ (індекс вагітності 40 %). Також високий рівень активності глутатіонпероксидази був майже у всіх самок в печінці і становив найвищий — у 2-й дослідній групі $16,67 \pm 0,23$ і найнижчий у групі самок з надлишковим введенням селену — $13,27 \pm 0,08$ (табл. 3). Нажаль, цифрові дані щодо активності глутатіонпероксидази в печінці у самок 2-й дослідної групи, були невірними ($P < 0,5$). Це збігається із стадіями становлення вагітності у

самок різних груп — у самок з найвищим рівнем настання вагітностей активність ферменту була найвища у матці, саме де відбуваються всі постімплантаційні процеси та у печенці — органі, який приймає участь у більшості обмінних процесів, які, як відомо пришвидшуються під час вагітності [5, 9].

Загалом, рівень активності глутатіонпероксидази залишався у межах норми і не сильно розрізнявся у самок в гурпах з різним індексом вагітності, що може свідчити про сталість системи антиоксидантних ферментів [1]. З іншої сторони, глутатіонпероксидаза може переривати ланцюгову реакцію перетворення жирних кислот у гідроперекиси і подальше їх нерадикальне окислювальне перетворення у ТБК-активні продукти [6] — у такому випадку такі невисокі коливання активності глутатіонової системи йдуть тільки на користь збереження ранньої вагітності.

Таблиця 3

Активність глутатіонпероксидази (г/хв) у гомогенатах внутрішніх органів самиць щурів на ранніх стадіях вагітності за умов введення селєнвмісного препарату (M±n)

Групи тварин	Тканини							
	Яєчники	Матка	Серце	Селезінка	Надирники	М'язи	Печінка	Нирки
Контроль	14,21±0,12	15,74±0,06	15,66±0,09	14,61±0,23	15,17±0,1	14,62±0,24	15,75±0,96	15,44±0,13
Дослідна 1	15,31±0,11*	16,92±0,04*	16,34±0,13*	15,86±0,58	15,68±0,19*	14,85±0,08	16,67±0,23	15,9±0,06**
Дослідна 2	13,62±0,48	14,7±0,23**	11,44±0,21*	12,62±0,13**	12,58±0,21*	13,11±0,03**	14,42±0,16	13,27±0,08*

Примітка: * — P < 0,05; ** — P < 0,01

Висновки

Підшкірне трьохразове введення препарату селєну щурам з депонуючою речовиною при активації статевої охоти за стандартною схемою з використанням ФСГ підвищує активність антиоксидантної системи та ферментів, що позитивно впливає на імплантаційні процеси, посилюючи взаємодію між материнським організмом та плодом.

Введення препарату селєну щурам в ранній період вагітності в досліджуваних дозах знижує активність ферментів антиоксидантного захисту, що негативно впливає на процеси становлення ранньої вагітності.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно було б вивчити дію препарату на інших критичних стадіях вагітності у ссавців.

S. V. Fyodorova, I. I. Nevkan, O. V. Shtapenko, Y. I. Slyvchuk

TBA-ACTIVE PRODUCTS CONTENT AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT DEFENCE ENZYMES IN HOMOGENATES OF INTERNAL ORGANS IN FEMALES OF RATS UNDER STIMULATION OF EMBRYO-UTERINE SIGNAL UNDER INJECTION OF SELENIUM CONTENT PREPARATION

Summary

Researches were spent for the purpose of working out new of selenium-content preparation of the prolonged action with depositing substance for activation of rat female sexual cycle and enhancement of embryo-uterine interactions formation at early stages of pregnancy. At definition of fertility level after application new selenium-content preparation we have found out that the pregnancy index was the highest in group of animals with triplex hypodermic injection of a preparation with selenium before fertilization. It is thus established that in a uterus and heart of animals of this group level as hydroperoxides and malonic dialdehydes was increased. Scheme of a preparation injection raises activity of enzymes – catalase in a uterus and in a liver and glutathione peroxidase in comparison with the control that evidenced in about activation of metabolism as a whole and antioxidant in particular.

С. В. Фёдорова, И.И. Гевкан, О.В. Штапенко, Ю.И. Сливчук

СОДЕРЖАНИЕ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ И ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ, А ТАКЖЕ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ГОМОГЕНАТАХ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ САМОК КРЫС ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНО-МАТОЧНОГО СИГНАЛА ПРИ ВВЕДЕНИИ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА

А н н о т а ц и я

Выявлено повышение антиоксидантных процессов под влиянием нового селенсодержащего препарата пролонгированного действия с депонирующим веществом для активации полового цикла у самок крыс и усиления у них формирования эмбрионально-маточных взаимодействий на ранних стадиях беременности. При определении уровня оплодотворяемости после применения нового селенсодержащего препарата мы обнаружили, что индекс беременности был наивысшим в группе животных с трёхразовым подкожным введением препарата селена до оплодотворения. При этом установлено, что в матке и сердце животных этой группы увеличивался уровень как гидроперекисей, так и ТБК-активных продуктов. Также предложенная схема введения препарата повышает активность в матке и в печени фермента глутатионпероксидазы по сравнению с контролем, что указывает на активацию обменных процессов в целом и антиоксидантных в частности.

1. *Ashok Agarwal, Sharma* Role of oxidative stress in female reproduction / Ashok Agarwal, Sajal Gupta and K. Rakesh // *Reproductive Biology and Endocrinology*. — 2005. — Vol. 3. — P. 28—34. — <http://www.rbej.com/content/3/1/28>

2. *Bartle L.* Influence of Injected Selenium in Dairy Bulls on Blood and Semen Selenium, Glutathione Peroxidase and Seminal Quality [Электронный ресурс] / L. Bartle, P. L. Senger and J. K. Hillers // *Biology of Reproduction*. — 1980. — Vol. 23. — P. 1007–1013. — Режим доступа до журн.:

http://www.bioreprod.org/cgi/search?sortspec=relevance&author1=&fulltext=Selenium%2Cglutathionperoxidase&pubdate_year=&volume=&firstpage=

3. *Gardiner C.* Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo [Электронный ресурс] / C. Gardiner and D.Reed // *Biology of Reproduction*. — 1994. — Vol. 51. — P. 1307–1314. — Режим доступа до журн.:

<http://www.bioreprod.org/cgi/reprint/51/6/1307?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Gardiner&fulltext=CS+Gardiner+and+DJ+Reed&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>

4. *Guerin P.* Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings / P. Guerin, El. Mouatassim S., Y. Menezo // *Human Reproduction Update*. — 2001. — Vol. 7. — P. 175–189. Режим доступа до журнала.:

<http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/reprint/7/2/175>

5. *Salmen James J.* Role of Glutathione in Reproductive Tract Secretions on Mouse Preimplantation Embryo Development [Электронный ресурс] / J. Salmen James, Frank Skufca, Ani Matt et al. // *Biology of Reproduction*. — 2005. — Vol. 73. — P. 308–314. — Режим доступа до журн.:

<http://www.bioreprod.org/cgi/reprint/73/2/308?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Gardiner&fulltext=CS+Gardiner+and+DJ+Reed&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>

6. *Catherine S. Gardiner.* Glutathione Is Present in Reproductive Tract Secretions and Improves Development of Mouse Embryos after Chemically Induced Glutathione Depletion

[Електронний ресурс] / Catherine S. Gardiner, James J. Salmen, Carolyn J. Brandt, and Shawn K. Stover. // *Biology of Reproduction*. — 1998. — Vol. 59. — P. 431–436. — Режим доступу до журн.:

<http://www.bioreprod.org/cgi/reprint/59/2/431?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Gardiner&fulltext=CS+Gardiner+and+DJ+Reed&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>

7. *Das S.* Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? [Електронний ресурс] / S. Das, R. Chattopadhyay, S. Ghosh et al. // *Human Reproduction*. — 2006. — Vol. 21. — P. 2403–2407. — Режим доступу до журн.:

<http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/reprint/21/9/2403?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=selenium%2Coxidative+stress%2Cpregnancy&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCIT>

8. *Ruder E. H.* Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility [Електронний ресурс] / E. H. Ruder, T. J. Hartman, J. Blumberg and M. B. Goldman // *Human Reproduction Update*. — 2008. — dmn011.1. — Режим доступу до журн.:

<http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/dmn011v1>

9. *Klapec T.* Selenium in placenta predicts birth weight in normal but not intrauterine growth restriction pregnancy. [Електронний ресурс] / T. [Klapec](#), S. [Cavar](#), Z. [Kasac](#) et al. // *Journal of trace elements in medicine and biology*. — 2008. — 2007. — Vol. 22, № 1. — P. 54–58. — Режим доступу до журн.:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319141?dopt=Abstract>

10. Umesh Dimri. Effect of vitamin E and selenium supplementation on oxidative stress indices and cortisol level in blood in water buffaloes during pregnancy and early postpartum period / Guerin P, El. Mouatassim S, Menezo Y. // [Tropical Animal Health and Production](#). — 2009. — P. 1573–1578.

Режим доступу до журн.:

<http://www.springerlink.com/content/72g7332725671334/>