

## АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ І ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ ЗА РІЗНОГО ОКИСНОГО НАВАНТАЖЕННЯ В ЕЯКУЛЯТАХ БУГАІВ

Н. В. Кузьміна

Інститут біології тварин НААН

*Вивчали активність ферментів антиоксидантного захисту та виживання спермійв за різної атмосфери інкубування сперми. Встановлено, що еякуляти бугаїв характеризуються активністю СОД –  $7,3 \pm 0,45$  % блок. реак./мг білка, ГПО –  $1,3 \pm 0,13$  ммоль/хв\*г білка, КАТ –  $0,21 \pm 0,028$  мкмоль/хв\*мг білка, а спермії – виживанням за температури  $0-4$  °С  $104 \pm 10,0$  год. Аерування та інкубування в атмосфері азоту сперми вірогідно підвищують ( $p < 0,001$ ) активність каталази та знижують активності СОД і ГПО, порівняно з контролем. При цьому, не залежно від умов атмосфери, тривалість виживання спермійв зменшується. Активність антиоксидантних ферментів проявляє сильну залежність від умов інкубування сперми: кореляційне відношення за атмосфери азоту для супероксиддисмутази –  $\eta^2 = 0,65$ , глутатіонпероксидази –  $\eta^2 = 0,71$ , каталази –  $\eta^2 = 0,92$  та виживання спермійв –  $\eta^2 = 0,50$  і за аерації, відповідно,  $\eta^2 = 0,91$ ,  $\eta^2 = 0,66$ ,  $\eta^2 = 0,86$  та  $\eta^2 = 0,59$ .*

**Ключові слова:** КАТАЛАЗА, ВИЖИВАННЯ, ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС, СПЕРМІЇ, СПЕРМА.

Після еякуляції спермії піддаються оксидативному стресу, що супроводжується різким збільшенням вмісту активних форм кисню (АФК) у спермі [1]. Ще більше генеруються АФК при підготовці до кріоконсервування (розрідженні, еквілібрації), заморожуванні і розморожуванні еякулятів. Це зумовлено активуванням вільнорадикальних процесів – окисненням ліпідних і білкових компонентів плазми сперми і розріджувачів, а також перекисним окисненням ненасичених жирних кислот мембран статевих клітин [2, 3]. Вказані зміни призводять до зниження активності, виживання і запліднювальної здатності статевих клітин. Проте, зростання окисних процесів і генерація АФК є необхідною умовою для прояву акросомної реакції та гіперактивного руху спермійв, запліднення ооцита [4].

Захист статевих клітин самців від руйнівної дії АФК, а також підтримання окисного балансу й регулювання процесів окиснення забезпечує багатокомпонентна антиоксидантна система. Ферменти глутатіонового циклу, каталаза (КАТ) і супероксиддисмутаза (СОД) створюють ензиматичний, а вітаміни А, Е і С – неензиматичний антиоксидантний захист [5]. Так, СОД захищає статеві клітини від надлишку супероксиданіонів ( $O_2^{\cdot-}$ ) та контролює їх капациацію [6, 7], глутатіонпероксидаза (ГПО) і каталаза руйнують  $H_2O_2$  та проявляють позитивну залежність з кількістю морфологічно нормальних спермійв в еякулятах, регулюють процес їх капациації [8, 9]. Проте, на фізіологічні характеристики спермійв (рухливість, виживання, капациацію) активність антиоксидантних ферментів впливає неоднозначно. Так, у спермі мишей СОД чи КАТ забезпечують капациацію статевих клітин, але разом вони зменшують цей процес навіть до нижчих значень, ніж спостерігається у контролі. У спермі хом'яків КАТ зменшує кількість спермійв з акросомною реакцією при їх капациації [10].

Отже, поряд з активністю антиоксидантних ферментів важливу роль відіграє їх баланс і, можливо, умови атмосфери, в яких інкубуються статеві клітини, присутність і доступність окиснювачів, зокрема кисню.

У зв'язку з цим вивчали активність антиоксидантних ферментів і тривалість виживання сперміїв в еякулятах бугаїв за різної атмосфери інкубування сперми.

**Матеріали і методи**

Досліджували еякуляти бугаїв, які отримували на штучну вагіну з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. Для досліджень брали еякуляти таких фізіологічних характеристик: об'єм 2,5–4,0 мл, концентрація сперміїв  $0,80\text{--}1,20 \times 10^9$  клітин/мл та їх активність 7,5–8,0 бала. Відібрану сперму ділили на частини: контрольну (за природної атмосфери) та дослідні: дослід I – насичували (за об'ємом) ~ 5 мл азотом; дослід II – аерували, пропускаючи через сперму, під тиском, ~ 5 мл атмосферного повітря. Проби герметично закривали і зберігали 24 год за температури 0–4 °С. Визначали: активність СОД [11], ГПО [12], КАТ [13], загальний білок методом О. Н. Lowry et al. [14] і виживання сперміїв (год) до припинення прямолінійного поступального руху. Статистичний аналіз результатів досліджень проведено за М. О. Плохінським (1969).

**Результати й обговорення**

Встановлено, що для еякулятів бугаїв характерні активності антиоксидантних ферментів: СОД –  $7,3 \pm 0,45$  % блок. реак./мг білка, ГПО –  $1,3 \pm 0,13$  ммоль/хв\*г білка, КАТ –  $0,21 \pm 0,028$  мкмоль/хв\*мг білка, а спермії проявляють виживання  $104 \pm 10,0$  год (табл.).

*Таблиця*

**Активність ферментів антиоксидантного захисту та виживання сперміїв за різної атмосфери інкубування еякулятів ( $M \pm m$ ,  $n=9$ )**

Активність ферментів	Контроль	Дослід 1	Дослід 2
СОД, % блок. реак./ мг білка	$7,3 \pm 0,45$	$6,3 \pm 0,25$	$5,2 \pm 0,26^{***}$
ГПО, ммоль/хв*г білка	$1,3 \pm 0,13$	$0,9 \pm 0,09^*$	$0,9 \pm 0,16$
КАТ, мкмоль/хв*мг білка	$0,21 \pm 0,028$	$0,37 \pm 0,019^{***}$	$0,41 \pm 0,035^{***}$
Вживання сперміїв, год	$104,0 \pm 10,0$	$88,0 \pm 4,0$	$80,0 \pm 9,0$

*Примітки:* \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , різниця статистично вірогідна порівняно з контролем.

Інкубування сперми в атмосфері азоту призводить до зміни активності ферментів антиоксидантного захисту і виживання сперміїв, порівняно до контролю. Зокрема, значно підвищується (у 1,7 рази;  $p < 0,001$ ) активність КАТ і вірогідно знижується (на 30,7 %;  $p < 0,05$ ) активність ГПО. СОД-активність сперми зменшується на 1 % блок. реак./мг білка. Зміни активності вказаних ферментів супроводжуються зниженням на 16 год (15,4 %) тривалості виживання сперміїв.

Більші відмінності активності ферментів, порівняно до контролю, виявлено за підвищеного вмісту кисню в спермі (за аерації). Так, активність КАТ зростає в 2,1 рази ( $p < 0,001$ ) і вірогідно знижується (на 2,1 % блок. реак./мг білка;  $p < 0,001$ ) активність СОД. ГПО-активність проявляє тенденцію до зниження величини показника (на 30,7 %;  $p > 0,05$ ). При встановлених змінах величин значень ферментів антиоксидантного захисту, виживання сперміїв зменшується на 24 год (23 %).

Про вплив атмосфери інкубування сперми (доступність окиснювачів) на ферменти антиоксидантного захисту й виживання сперміїв свідчить величина

кореляційного відношення. Так, у спермі за анаеробних умов (атмосфера азоту) кореляційне відношення для супероксиддисмутази становить  $\eta^2 = 0,65$ , глутатіонпероксидази –  $\eta^2 = 0,71$  і каталази –  $\eta^2 = 0,92$ . При цьому, для виживання сперміїв встановлено середньої сили кореляційну залежність ( $\eta^2 = 0,50$ ). За дії підвищеного вмісту кисню (аерації), порівняно з атмосферою азоту, зростає залежність активності СОД (кореляційне відношення –  $\eta^2 = 0,91$ ) та зменшується вплив на активності глутатіонпероксидази і каталази (кореляційне відношення, відповідно,  $\eta^2 = 0,66$  і  $0,86$ ). Виживання сперміїв за аерації виявляє середньої сили кореляційну залежність ( $\eta^2 = 0,59$ ).

Зміни активності ферментів антиоксидантного захисту і виживання сперміїв залежно від умов проведення дослідів вказують на те, що як аерація, так і насичення азотом сперми порушують в еякулятах бугаїв фізіологічно нормальний перебіг окисних процесів. Такі зміни зумовлені, перш за все, зростанням АФК. Про підвищене утворення пероксиду гідрогену свідчить активність каталази, яка знищує вказану сполуку в організмі тварин [15]. Очевидно, виявлена залежність для органів і тканин організму тварин справедлива й для сперми бугаїв.

Однак, зростання АФК і активування КАТ може бути зумовлено й особливостями енергозабезпечення сперміїв, які виявляються за умов дослідів. Відомо, що для здійснення фізіологічних функцій спермії отримують енергію за рахунок гліколізу (аеробного чи анаеробного) і дихання (ланцюга дихання мітохондрій). Отже, при дефіциті кисню (за атмосфери азоту) статеві клітини, поряд з анаеробним гліколізом, окиснюють субстрати плазми сперми для ресинтезу АТФ. Вказане стимулює утворення перекисів й, відповідно, активування КАТ. Своєю чергою, в процесі розщеплення  $H_2O_2$  КАТ забезпечує додаткову кількість Оксигену для ефективного функціонування ланцюга дихання мітохондрій і окисного фосфорилування [16]. Припущення підтверджується встановленим зниженням активності СОД і кореляційним відношенням – менша сила залежності СОД від анаеробних умов інкубування, порівняно зі спермою за дії підвищеного вмісту кисню. Така закономірність узгоджується з результатами вивчення електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, з яких випливає, що підвищена інтенсивність генерації АТФ може супроводжуватись утворенням супероксиданіонів НАДН-оксидоредуктазним, сукцинатдегідрогеназним та цитохром с редуктазним комплексами органел і, відповідно, активуванням СОД [17, 18]. Однак, як свідчать результати досліджень, аерування сперми було недостатньою умовою для гіперактивування дихального ланцюга сперміїв і, відповідно, генерації супероксиданіонів та активуванням СОД.

#### **Висновки**

1. Свіжоотримані еякуляти бугаїв характеризуються активністю СОД –  $7,3 \pm 0,45$  % блок. реак./мг білка, ГПО –  $1,3 \pm 0,13$  ммоль/хв\*г білка, КАТ –  $0,21 \pm 0,028$  мкмоль/хв\*мг білка, а спермії виживанням –  $104 \pm 10,0$  год.
2. Аерування та інкубування в атмосфері азоту сперми вірогідно підвищують ( $p < 0,001$ ) активність каталази та знижують активності СОД і ГПО, порівняно з контролем.
3. Тривалість виживання сперміїв зменшується при інкубуванні сперми як за умов аерування, так і за атмосфери азоту.
4. Умови інкубування сперми проявляють сильний вплив ( $\eta^2 = 0,65–0,92$ ) на активність антиоксидантних ферментів та середньої сили вплив ( $\eta^2 = 0,50–0,59$ ) на виживання сперміїв.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати можуть бути використані при розробці тест-систем для визначення запліднювальної здатності сперміїв.

*N. V. Kuzmina*

#### **ANTIOXIDANT PROTECTION AND THE SURVIVAL OF SPERMATOZOA IN VARIOUS OXIDATIVE STRESSES IN BULL EJACULATES**

##### **S u m m a r y**

The activity of antioxidant protection enzymes, and spermatozoa survival in different incubation atmosphere of sperm were studied. It was established that bull ejaculates are characterized by activity of SOD –  $7,3 \pm 0,45$  % block. reac./mg protein, GPO –  $1,3 \pm 0,13$  mmol/min\*g protein, KAT –  $0,21 \pm 0,028$  mkmol/min\*g protein, and spermatozoa – by survival temperature  $0-4$  °C  $104 \pm 10,0$  h. Aeration and incubation in nitrogen atmosphere of sperm were likely to increase ( $p < 0,001$ ) activity of catalase and decrease activity of SOD and GPO, comparatively with the control. While, regardless of atmospheric conditions, the time of survival of spermatozoa decreases. The activity of enzymes of antioxidant protection shows large dependence from incubation conditions of sperm: correlation relation at nitrogen atmosphere for superoxide dismutase –  $\eta^2 = 0,65$ , glutathione peroxidase –  $\eta^2 = 0,71$ , catalase –  $\eta^2 = 0,92$  and spermatozoa survival –  $\eta^2 = 0,50$ , when aerated:  $\eta^2 = 0,91$ ,  $\eta^2 = 0,66$ ,  $\eta^2 = 0,86$  та  $\eta^2 = 0,59$ .

*Н. В. Кузьміна*

#### **АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА И ВЫЖИВАНИЕ СПЕРМИЕВ ПРИ РАЗНОЙ КИСЛОРОДНОЙ НАГРУЗКЕ В ЭЯКУЛЯТАХ БЫКОВ**

##### **А н н о т а ц и я**

Изучали активность ферментов антиоксидантной защиты и выживания спермиев при разной атмосфере инкубирования спермы. Установлено, что эякуляты быков характеризуются активностью СОД –  $7,3 \pm 0,45$  % блок. реак./мг белка, ГПО –  $1,3 \pm 0,13$  ммоль/мин\*г белка, каталазы –  $0,21 \pm 0,028$  мкмоль/мин\*мг белка, а спермии – выживанием при температуре  $0-4$  °C  $104 \pm 10,0$  час. Аэрирование и инкубирование в атмосфере азота спермы достоверно повышают ( $p < 0,001$ ) активность каталазы и снижают активности СОД и ГПО, в сравнении с контролем. При этом не зависимо от условий атмосферы, длительность выживания спермиев уменьшается. Активность антиоксидантных ферментов проявляет сильную зависимость от условий инкубирования спермы: корреляционное отношение в атмосфере азота для супероксиддисмутазы –  $\eta^2 = 0,65$ , глутатионпероксидазы –  $\eta^2 = 0,71$ , каталазы –  $\eta^2 = 0,92$  и выживание спермиев –  $\eta^2 = 0,50$  и при аэрации, соответственно  $\eta^2 = 0,91$ ,  $\eta^2 = 0,66$ ,  $\eta^2 = 0,86$  и  $\eta^2 = 0,59$ .

1. *Davies K. J.* Oxidative stress, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement systems / K. J. Davies // IUBMB Life. – 2000. – Vol. 50. – P. 279–289.
2. *Ferrusola O. C.* Effect of Cryopreservation on Nitric Oxide Production by Stallion Spermatozoa / O. C. Ferrusola, G. L. Fernandez, M. B. Garcia et all // Biol. Reprod. – 2009. – Vol. 81, N. 6. – P. 1106–1111.
3. *Awda B. J.* Reactive oxygen species and boar sperm function / B. J. Awda, M. Mackenzie-Bell, M. M. Buhr // Biol. Reprod. – 2009 – Vol. 81, N. 3. – P. 553–561.
4. *De Lamirande E.* Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa / De Lamirande E., C. Gagnon // Free Radical Biology and Medicine. – 1995.– Vol. 18. – P. 487–495.

5. *Cadenas E.* Oxidative stress and formation exited species. Oxidatyve stress H. Sies. Academic Press. – 1985. – P. 311–330.
6. *De Lamirande E.* Increased production of intra- and extracellular superoxide anion by capacitating human spermatozoa/ De Lamirande E., Gagnon C. // J. of Andrology.– 1995.– Vol. 1.– P.54.
7. *De Lamirande E.* Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids / De Lamirande E., D. Eiley, C. Gagnon // International J. of Andrology. – 1993. – Vol. 16. – P. 258–266.
8. *Bartle J. L.* Glutathione peroxidase and semen qality / J. L. Bartle, P. L. Senger // J. Anim. Sci. – 1980. –Vol. 51. – P. 258.
9. *Griveau J. F.* An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation / J. F. Griveau, P. Renard, Le Lannou D. // Int. J. of Andrology. – 1994.– Vol. 17. – P. 300–307.
10. *Bize I.* Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro / I. Bize, G. Santander, P. Cabello // Biol. of Reprod. – 1991.– Vol. 44. – P. 398–403.
11. *Чевари С. Н.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Н. Чевари, Т. А. Андян, Я. И. Штрэнгер // Лаб. дело. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
12. *Моим В. М.* Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моим // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 16–19.
13. *Королюк М. А.* Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1991. – № 12. – С. 9–10.
14. *Lowry O. H.* Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Fair et all // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 264–275.
15. *Данчук В. В.* Пероксидне окиснення у сільськогосподарських тварин і птиці / В. В. Данчук. – Кам'янець-Подільський : Абетка, 2006. – 191 с.
16. *Коробов В. Н.* Сравнительный анализ кислородсвязывающих и антиоксидантных свойств крови лабораторных животных и ондатры *Ondatra Zibethica* / В. Н. Коробов, Н. И. Климишин, Н. В. Павлюк и др. // Ж. эвол. биохим. и физиол. – 1995. – № 3. – С. 369–372.
17. *Turrens J. F.* Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J. F. Turrens // J. Physiol. – 2003 –Vol. 552. – P. 335–344.
18. *Gavella M.* NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men / M. Gavella, V. Lipovac // Arch. Androl. – 1992. – Vol. 28. – P. 135–141.

**Рецензент:** завідувач лабораторії фізіології та патології відтворення тварин, доктор ветеринарних наук, с. н. с. Шаран М. М.