

УДК 636.4; 612,6

Шостя А.М., к.б.н., старший науковий співробітник ©

E-mail: pigbreeding@ukr.net

*Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН,
м. Полтава, Україна*

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ У СПЕРМІ КНУРЦІВ МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРОДИ У ПЕРІОД СТАНОВЛЕННЯ СТАТЕВОЇ ФУНКЦІЇ

У статті висвітлено особливості прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в спермі кнуриців миргородської породи в період становлення статевої функції. Встановлено, що в цей період процеси ВРПО у спермі молодих кнуриців найбільш інтенсивно прискорюються протягом 6 - 8-го місяців розвитку. Рівень антиоксидантних ензимів (СОД і КТ) істотно зростає від 150-ї до 240-ї доби життя, а насиченість антиоксидантами (ГТ, АК і ДАК) знижується зі збільшенням віку тварин. Інкубування сперми призводить до суттєвого прискорення процесів ВРПО та виснаження системи АОЗ. Найбільш вразливою до дії температурного фактора ця досліджувана тканина була у кнуриців 5 - 7-місячного віку.

Ключові слова: кнури, сперма, прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, антиоксиданти, каталаза, дієнові кон'югати, малоновий діальдегід.

УДК 636.4; 612,6

Шостя А.М., к.б.н., старший науковий співробітник*Інститут свиноводства і агропромислового виробництва НААН,
г. Полтава, Україна*

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ В СПЕРМЕ ХРЯЧКОВ МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРОДИ В ПЕРІОД СТАНОВЛЕННЯ ПОЛОВОЇ ФУНКЦІЇ

В статті представлені окремі особливості прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в спермі хрячків в період становлення полові функції. Встановлено, що в цей період процеси ВРПО прискорюються в спермі молодих хрячків на протязі 6 - 8 місяців розвитку. Рівень антиоксидантних ензимів (СОД, КТ) зростає з 150-х до 240-х діб розвитку, а неензимних антиоксидантів (ГТ, АК і ДАК) знижується з віком тварин. Інкубування сперми призводить до суттєвого прискорення процесів ВРПО та виснаження системи АОЗ. Особливо вразливою до дії температурного фактора була в 5-7-місячних хрячків.

Ключевые слова: хрячки, сперма, прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, антиоксиданти, каталаза, дієнові кон'югати, малоновий діальдегід.

UDC 636.4; 612.6

A. M. Shostia, a candidate of biological sciences, a senior research worker
Institute of Pig Breeding and agroindustrial production of NAAS, Poltava, Ukraine

PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT HOMEOSTASIS IN SPERM OF BOARS OF MIRGOROD BREED IN THE PERIOD OF A FORMATION OF SEXUAL FUNCTION

In the article it is lit up peculiarities of prooxidant and antioxidant homeostasis in sperm of boars of Mirgorod breed in the period of a formation of sexual function. It was determined that processes FRPO are accelerated in sperm of young boars the most intensively during 6-8 months of the development in this period. The level of antioxidant enzymes (SOD and CT) substantially is increased from 150 day to 240 day of life and the saturation by antioxidants (CT, AA and DC) is lowered at increasing the age of animals. The incubation of sperm causes to the essential increasing processes FRPO and the exhaustion of a system AO3. The most sensitive to the action of a temperature factor this research tissue was in 5th -7th months young boars.

Key words: boars, sperm, prooxidant and antioxidant homeostasis, antioxidants, catalase, dirnconjugates, malonaldehyde.

Вступ. Комерційне використання сперми кнурів для штучного осіменіння свиней вимагає більш раннього віку їх введення в основне стадо та забезпечення господарств спермою високої якості, а отримання кожної додаткової спермодози з відібраного еякуляту має суттєве економічне значення. Це вимагає розроблення ефективних методів прогнозування якості спермопродукції, особливо в аспекті окислювального стресу, розкриття ролі неферментних та ферментних антиоксидантів.

Статеві клітини, особливо спермії є дуже чутливими до зміни прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в організмі тварин. Надмірний вміст активних форм кисню (АФК) у зовнішньому і внутрішньому середовищі гамет часто викликає пошкодження органел та порушення їх функціонування.

Джерелами реактивних форм кисню у спермі є мітохондрії і плазматичні мембрани сперматозоїдів. Однією з властивостей сперматозоїдів є продукування власного фізіологічного рівня вільних радикалів і аніонів пероксидів, що є необхідним фактором для стимуляції процесів їх гіперактивації і капацитації, реакції прилипання до зони пелюциди ооциту, а також злиття з ооцитом. Однак, надмірний рівень АФК може спричинити зниження рухливості сперміїв та порушення процесів запліднення [1, 2, 3].

Зміна складу мембран у сперміях, конденсація хроматину, набуття ними здатності рухатися, створення потенціалу (здатність генерувати АФК і пероксид) для капацитації, перебувають під динамічним контролем прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу середовища. Будь-які різкі зміни цього гомеостазу призводять до зниження біологічної повноцінності сперматозоїдів: порушення процесів їх формування, здатності до запліднення, цілісності ДНК – однієї з основних причин загибелі зигот, ембріонів і аномалій у потомства.

Розкриття закономірностей перебігу процесів вільнорадикального перекисного окислення (ВРПО) у спермі дасть можливість розробити ефективні методи і способи для корекції якості спермопродукції з подальшим отриманням повноцінного потомства.

Основною метою досліджень було з'ясувати закономірності і особливості прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в спермі кнурців миргородської породи у період становлення статевої функції.

Матеріал і методи досліджень. В експериментах використовували кнурців миргородської породи, яких оцінювали за показниками власної продуктивності, привчали до садки на чучело, брали сперму за розробленим нами оригінальним способом [4] і досліджували їх якість спермопродукції. Утримували кнурців у приміщенні елевелу по 2 голови в станку за вільно-вигульного режиму.

Годівлю піддослідних тварин проводили двічі на добу згідно з кормовими нормами ІС і АПВ НААН комбікормом за рецептом СК-55-25. Усі піддослідні тварини були клінічно здоровими, за ростом і розвитком належали до першого класу та класу еліта.

Упродовж 5-го і до 10-місячного віку від кнурців одержували сперму мануальним методом. У досліді використовували таке статеве навантаження кнурців: від 5 до 8 місяця - 4 садки на місяць, а з 9 по 10 місяць - 8 садок. Показники спермопродукції визначали за такими методами: об'єм – вимірюванням циліндром, концентрацію – фотоколориметричним, рухливість і виживаність – мікроскопічним, терморезистентну пробу сперматозоїдів шляхом визначення рухливості до та після інкубування при $t=38^{\circ}\text{C}$.

Для оцінки прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу відбирали зразки сперми від 5-ти кнурців у процесі їх вирощування та використання, щомісячно від 5-го до 10-го місяця життя. Оцінювали рівень перебігу ВРПО у спермі за концентрацією первинних продуктів пероксидації – дієнових кон'югатів (ДК) спектрофотометрично [5, 6] та вторинних продуктів - альдегіди і кетони, що реагують із 2-тиобарбитуровою кислотою, які визначали фотоколориметрично. Серед них найбільшу частку (до 40%) становить малоновий диальдегід (МДА) [7].

Рівень антиоксидантного захисту в спермі кнурців оцінювали, використовуючи наступні показники та методи їх дослідження. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали фотометрично [8]. Для визначення активності каталази (КТ) у спермі було застосовано спектрофотометричний метод [9]. Вміст глутатіону (ГТ) визначали за допомогою реактиву Елмана [10]. Кількість аскорбінової (АК) і дегідроаскорбінової кислот (ДАК) визначали фотометрично [7]. Активність ферментних і вміст неферментних антиоксидантів та метаболітів у спермі кнурців розраховували на 0,2 мільярди сперміїв в 1 мл.

Результати досліджень. Отримані результати експерименту свідчать, що в кнурців об'єм еякуляту протягом досліджуваного періоду підвищувався в 2,7 раза ($p<0,001$), при цьому найбільш інтенсивно зростає впродовж 6-го місяця в 1,8 раза ($p<0,001$) (табл. 1). Упродовж 7-го і 8-го місяців життя також

встановлено суттєве зростання об'єму еякуляту в - 1,2 раза, а в наступний період, від 8-го до 10-го місяця продовжувалось підвищення на 25,7%.

Аналіз концентрації сперматозоїдів в еякуляті показав, що від 150 –ї до 210 –ї діб розвитку кнурів спостерігалось суттєве підвищення цього показника до максимального рівня в 1,7 раза ($p < 0,001$). Впродовж 9-го і 10-го місяців розвитку цей показник зменшувався.

Таблиця 1

Динаміка показників якості спермопродукції у кнурців миргородської породи, (M+m)

Вік тварин, місяців	Кількість дослідних доз спермій	Показники		
		об'єм еякуляту, мл	концентрація сперматозоїдів, млрд/мл	загальна кількість живих сперматозоїдів, млрд.
5	16	60,63±5,48	0,204±0,01	7,90±0,84
6	16	107,13±6,43***	0,271±0,01***	21,55±0,68***
7	16	121,38±4,62***	0,342±0,022***	32,98±1,58***
8	16	129,94±4,70***	0,333±0,02***	35,78±2,15***
9	32	152,81±3,9***	0,283±0,01***	37,09±2,57***
10	32	163,38±5,08***	0,241±0,01*	29,49±3,5***

Примітка: рівень вірогідності різниці порівняно із 5-м місяцем розвитку – *- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$;

В еякуляті кількість живих сперматозоїдів зі збільшенням віку тварин істотно зростала протягом експериментального періоду з 7,90 до 37,09 млрд. Найбільш інтенсивно підвищувалась кількість цих гамет від 150 –ї до 180 –ї діб життя у 2,7 раза ($p < 0,001$). Слід зазначити, що кількість живих сперматозоїдів в еякуляті при досягненні кнурцями 9-місячного віку досягала максимальних значень, порівняно з початковим періодом, зросла в 4,7 раза ($p < 0,001$). Упродовж 10-го місяця розвитку кнурців відбувалось зниження цього показника.

Дослідження рухливості і переживаності сперматозоїдів у кнурців 5-10-місячного віку показало, що їх активність коливалась від 63,7 до 83,1%. У кнурців зі збільшенням віку спостерігалось зростання активності гамет. Так, упродовж 6-го місяця життя відбувалось підвищення активності сперматозоїдів у кнурців на 14%, у той час як їх переживаність зросла відповідно в 1,9 раза. Рівень досліджуваних показників продовжував підвищуватись до досягнення тваринами 240-денного віку, а в наступні місяці спостерігалась стабілізація цього показника. Отже, рівень спермопродукції в молодих кнурців від 5-го до 8-го місяця життя істотно збільшується. Одержання по два еякуляти на тиждень від кнурців 9-10 - місячного віку, в основному, не викликало зниження якості спермопродукції.

У спермі ростучих кнурців активність СОД змінювалась у таких межах від 0,18 до 0,66 УО/мл, де мінімальний показник зареєстровано на 150-ту добу, а максимальний 240-у, що відображає загальне зростання рівня цього ензиму протягом зазначеного періоду ($p < 0,001$) (Табл. 2).

У подальшому при збільшенні статевого навантаження активність цього ензиму знижувалась протягом 9 і 10-го місяця розвитку на 30,3%.

Рівень функціонування СОД у спермі кнурців, після її інкубування, знижувався, але цей вплив зменшувався із збільшенням їх віку. Так, у 5-місячному віці активність цього ензиму у цій проінкубованій тканині знижувалась на 33,3%, а по досягненні ними 6- і 7- місячного віку зменшення її рівня становило 40%. Зниження активність СОД у проінкубованій спермі спостерігалось і по закінченні 9-го і 10-го місяців розвитку, будучи в межах 4 – 13%.

Дані досліджень свідчать про лабільність рівня КТ у спермі кнурців, який змінювався з 26,63 по 43,35 мкмоль H_2O_2 /хв.мл, де перша величина зареєстрована на 150 – й, а друга - 240 – й день розвитку. У цілому загальною закономірністю зміни цього ензиму було зростання активності від 5 – го до 8 – ми місячного віку на 62,8% ($p < 0,05$), з подальшим його зниженням. Істотний спад активності КТ у цій тканині відбувався після інкубування зменшуючись на 25,1 (150-та), 22,5 (180-та), 21,3% (210-та доба життя). Після закінчення 240-ї та 270-ї діб розвитку рівень цього ферменту майже не знижувався. Впродовж 10-го місяця розвитку спостерігалось незначне підвищення рівня досліджуваного ензиму після інкубації зразків сперми.

Концентрація ГТ у спермі кнурців знаходиться в межах від 0,405 до 0,748 мкмоль/л. Насиченість ГТ у досліджуваній тканині протягом експерименту зменшилась на 42,4% ($p < 0,01$). Особливістю динаміки цієї речовини було зниження її кількості від 150-ї до 270-ї доби в 1,8 раза ($p < 0,001$), з наступним зростанням упродовж 10-го місяця на 6,4%. Процес інкубування сперми суттєво знижував концентрацію ГТ у спермі кнурців 5-, 6-, 7- і 8-місячного віку відповідно на 23,5; 17,8; 33,6 та 28,8%. У цілому в подальші періоди вплив температурного фактора на кількість цього метаболіту зменшувався.

Кількість АК у спермі молодих кнурців знаходилась в діапазоні від 44,42 до 66,63 мкмоль/л, а ДАК з 42,49 по 54,21 мкмоль/л, залежно від віку. Мінімальним вмістом АК у досліджуваній тканині впродовж експериментального періоду характеризувались тварини у віці 10 місяців, а максимальним - 5 місяців. Дані вказують на те, що зі збільшенням віку кнурців насиченість сперми аскорбіновими кислотами зменшується: відновленої форми в 1,4 ($p < 0,05$), а окисленої в 1,3 раза. Встановлено, що найбільш істотний спад концентрації АК, на 32,2%, відбувся протягом 6-го місяця життя, з наступним плато впродовж 7-го, 8-го місяців. Проте вже протягом останніх двох місяців експерименту спостерігалось подальше зменшення її концентрації. Рівень ДАК протягом експерименту поступово знижувався. Кількість окисленої форми аскорбінової кислоти порівняно з відновленою була вищою з 7-го по 9-й місяці розвитку, а різниця між ними становила на 210-ту добу – 12,6, 240-ту – 7,1, 270-у – 17,9%.

Таблиця 2

Динаміка перебігу процесів ВРПО в спермі кзурців м'яггородської породи, (Мг-м)

Показники ВРПО	Вікварин, місяців																			
	5		6		7		8		9		10									
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2								
СО ₂	0,18	0,12	0,25	0,15	0,44	0,26	0,66	0,46	0,5	0,48	0,46	0,4								
Уо/мл	±0,044	±0,026	±0,043	±0,038	±0,065	±0,064	±0,136	±0,074	±0,103	±0,078	±0,097	±0,077								
КТ, мкмоль	26,63	19,96	33,28	25,80	39,13	30,78	43,35	41,63	40,42	42,51	36,67	42,57								
Н ₂ О ₂ /хв.мл	±4,14	±2,34	±6,47	±3,82	±4,41	±2,83	±5,90	±4,41	±4,51	±6,19	±7,67	±5,57								
ГТ, мкмоль/л	0,748	0,572	0,669	0,550	0,530	0,352	0,521	0,371	0,405	0,354	0,431	0,371								
	±0,071	±0,063	±0,072	±0,087	±0,097	±0,098	±0,08	±0,073	±0,06	±0,061	±0,064	±0,065								
АК, мкмоль/л	66,63	46,23	55,32	42,26	45,61	41,69	48,48	38,74	44,42	35,05	47,41	30,50								
	±5,95	±5,29	±1,78	±2,36	±6,04	±3,63	±3,27	±5,19	±5,11	±5,66	±1,58	±3,71								
ДАК, мкмоль/л	54,21	53,68	49,29	46,04	51,35	43,70	51,97	41,15	52,39	40,11	42,49	41,09								
	±6,01	±6,59	±6,15	±4,70	±4,09	±4,05	±4,72	±4,40	±3,48	±3,84	±3,87	±4,38								
ДК, мкмоль/л	0,55	0,73	0,69	0,75	1,03	1,15	1,25	1,37	1,47	1,56	1,55	1,87								
	±0,08	±0,07	±0,10	±0,09	±0,18	±0,2	±0,13	±0,14	±0,12	±0,09	±0,12	±0,13								
МДА, мкмоль/л	2,85	8,26	5,01	8,26	10,52	13,52	14,72	16,68	18,48	21,34	15,17	18,93								
	±0,58	±0,71	±0,69	±0,69	±1,49	±1,60	±2,45	±2,61	±2,09	±1,49	±2,5	±3,09								

Примітка: 1 – до інкубації; 2 – після інкубації;

Після інкубування сперми кнурців встановлено зниження кількості аскорбінових кислот. Це підтверджують отримані дані, а саме: на 150-ту добу розвитку концентрація АК зменшувалась на 30,6%, а ДАК майже не змінювалась. Після закінчення 6-го місяця розвитку вплив 3-х годинного інкубування майже не позначився на кількості ДАК, а вміст АК у цій тканині зменшився на 23,6%. У наступні місяці також відбувалось істотне зниження АК і ДАК після дії цього температурного фактора відповідно на 8,6 і 14,9 (7-й місяць), 20,1 та 20,8 (8-й місяць), 21,1 і 23,4% (9-й місяць), 35,7 та 3,3% (10-й місяць життя).

Концентрація ДК у спермі кнурців протягом досліджуваного періоду була лабільною, коливаючись у діапазоні 0,55 ... 1,55 мкмоль/л. Перший показник встановлено на початку (150 – та доба), другий - після закінчення (300 – та доба) експерименту, що свідчить про зростання концентрації цих речовин у 2,8 ($p < 0,001$) рази. Особливістю динаміки ДК під час дослідження було зростання кількості цих речовин відносно початку досліджень на 25,5 (180-а доба) і 87,2% ($p < 0,05$) (210-а доба життя). Упродовж 8-го і 9-го місяців концентрація досліджуваного метаболіту в тварин суттєво не змінювалась, але протягом 10-го місяця відмічалось незначне зростання на 5,4%. Процес інкубування сперми суттєво впливав на збільшення вмісту ДК на 32,7 у 150-денному віці, а в наступні періоди їх концентрація підвищувалась у межах 6,1-11,7%, за винятком 10 місяця розвитку, коли він істотно зростав на 20,6%.

Концентрація МДА в спермі кнурців залежно від віку становила від 2,85 до 18,48 мкмоль/л. Мінімальний показник виявлено на 5-й місяць, а максимальний на 9-й місяць життя. Вміст цієї речовини змінювався таким чином: стрімке збільшення концентрації в 1,7 раза впродовж 6-го місяця ($p < 0,05$), з подальшим істотним її підвищенням в 2,1 раза протягом 7-го місяця життя. Така закономірність спостерігалась упродовж 8 - 10 - го місяців розвитку до максимальних значень.

Дані експерименту вказують на те, що 3-годинне інкубування сперми кнурців протягом досліджуваного періоду призводить до прискорення перебігу процесів ВРПО, що підтверджується підвищенням рівня МДА. Інтенсивність накопичення МДА в інкубованій спермі цих тварин зменшувалась зі збільшенням їх віку. Найбільше утворення МДА у цій тканині після її інкубування спостерігалось у 5- місячному віці в 2,8 рази ($p < 0,001$). Проте, вже після закінчення 6-го і 7-го місяця розвитку відбувалось зниження показників приросту МДА під дією температурного фактора відповідно на 1,64 та 1,3 рази. Менш вразливою до інкубування була сперма 8 та 9- місячних кнурців, де вміст цієї речовини зростав на 13 – 15,5%. Після закінчення досліджень встановлено суттєве продукування МДА, яке становило 24,8%.

Висновки.

1. Рівень спермопродукції в молодих кнурців миргородської породи від 150-ї до 240-ї доби розвитку суттєво збільшується. Одержання по два еякуляти на тиждень від кнурців 9 – 10-місячного віку, в цілому, не викликає зниження якості спермопродукції.

2. У період становлення статевої функції в спермі молодих кнурців процеси ВРПО найбільш інтенсивно прискорюються протягом 6-го, 7-го і 8-го

місяців розвитку. Рівень антиоксидантних ензимів (СОД і КТ) істотно зростає від 150-ї до 240-ї діб життя, а насиченість антиоксидантами (ГТ, АК і ДАК) знижується зі збільшенням віку тварин.

3. Інкубування сперми призводить до суттєвого прискорення процесів ВРПО та виснаження системи АОЗ, найбільш вразливою досліджувана тканина до дії температурного фактора була у кнурців 5-, 6- і 7- місячного віку.

Перспективи подальших досліджень. Наступні дослідження з вивчення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у спермі кнурців у період становлення статевої функції будуть спрямовані на з'ясування його особливостей у кнурців м'ясного типу продуктивності та розробки засобів регуляції їх репродуктивної здатності, шляхом впливу на цей гомеостаз.

Література

1. Oeda L., Schill O. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa// International Journal of Andrology. - 1999.-Vol 22.- Issue 1.- P. 37.

2. Lamirandea E., Gagnona C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa// Free Radical Biology and Medicine. - 1995. –Vol. 18.- Issue 3.- P. 487-495.

3. Aitkena R. J., Buckingham D. W., Carrerasb A. Superoxide dismutase in human sperm suspension: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function// Free Radical Biology and Medicine. -1996. –Vol. 21.- Issue 4.- P. 495-504.

4. Деклараційний патент на винахід № 66662 А Україна, А61D19/00. Спосіб ефективного привчання кнурців до садки на чучело / Коваленко В.Ф., Шоста А.М., Біндюг О.А.; заявник Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького УААН. - № U2003098146 заявл. 01.09.2003; опубл. 17.05.2004, Бюл. № 5

5. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот//В кн.:Современные методы биохимии.- Медицина, -1977.-С.63-64.

6. Владимиров Ю.А., Арчков А.И. Перекисное окисление в биологических мембранах// –М.:Наука, 1972.-С.272.

7. Посібник з експериментально-клінічних досліджень з біології та медицини. За редакцією І.П.Кайдашева. -1996.-Полтава. –С.123-128 с.

8. Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина //Бюлл. эксп. биол. и мед. -1976. -N1. -С.33-35,

9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.. Метод определения активности каталазы//Лабораторное дело. – 1988. -№1. С. 16-19.

10. Elmann G.L. Tissue sulphhydryl groups //Arch. Biochem. -1959.- №82.-P.70-77.

Рецензент – д.вет.н., професор Стефаник В.Ю.