

УДК 619:618.591.463.12:636.2

ЦЕХМІСТРЕНКО С.І., д-р с.-г. наук

КОБЕРСЬКА В.А., аспірантка

*Білоцерківський національний аграрний університет*

## **ВПЛИВ УМІСТУ МАЛОНОВОГО ДІАЛЬДЕГІДУ ТА РІВНЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ЕЯКУЛЯТАХ БУГАЇВ НА ЯКІСТЬ СПЕРМИ**

Наведені результати визначення вмісту малонового діальдегіду, активності супероксиддисмутази, каталази й глутатіонпероксидази в спермі бугаїв з нормальними та порушеними показниками якості сперми. Встановлено, що за підвищеного вмісту малонового діальдегіду та зниженої активності каталази й глутатіонпероксидази в спермі бугаїв знижується рухливість, концентрація, виживання спермій, збільшується кількість патологічних форм та мертвих спермій.

**Ключові слова:** бугаї, якість сперми, пероксидне окиснення ліпідів, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, малоновий діальдегід.

**Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій.** Важливим патогенетичним елементом розвитку неплодності самців (незалежно від етіології) є вплив окиснювального стресу, що викликає накопичення продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), до яких особливо чутливими є спермії [9, 11]. При цьому відбувається розшарування ліпідного бішару мембран, що спричинює значні розлади у функціонуванні ферментів, відбувається полімеризація й гідроліз білків, деструкція молекул ДНК, підвищується концентрація внутрішньоклітинного Кальцію та активується некроз клітин [2, 8].

Регуляція процесів ПОЛ забезпечується антиоксидантними ферментами супероксиддисмутазою (СОД), каталазою, глутатіонпероксидазою (ГПО) [2].

У зв'язку з тим, що функціональна активність спермій тісно пов'язана з інтенсивністю процесів ПОЛ в організмі, **метою роботи** було визначення активності деяких антиоксидантних ферментів та вмісту малонового діальдегіду в сироватці крові бугаїв з нормальними та порушеними показниками якості сперми.

**Матеріал і методи досліджень.** Дослідження проводили на базі Української Генетичної Компанії «UGC» та Інституту біології тварин НААН. Використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв, які в подальшому змішували із середовищем для розбавлення сперми Bioexel (1:1).

Після проведення візуальної, мікроскопічної та лабораторної оцінки якості сперми тварин розділили на дві групи: перша – бугаї із вищими показниками якості сперми (контроль), друга – із зниженими показниками: аглютинація, зниження рухливості та виживання спермій, збільшення частки патологічних форм та мертвих спермій.

У розбавленій спермі визначали активність СОД [7], каталази [3] та ГПО [6]. Для оцінки рівня процесів ПОЛ досліджували вміст МДА [1]. Аналізували виживання спермій за температури 2–4 °С до припинення ними прямолінійного поступального руху (год.). Статистичний аналіз отриманих результатів проведено з використанням персонального комп'ютера та програми Microsoft Office Excel.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результатами проведених досліджень доведено, що стан системи антиоксидантного захисту в спермі впливає на показники її якості та виживання спермій (табл. 1).

У величинах активності ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) було відмічено різноспрямовані зміни. У спермі зі зниженими показниками (2 група) на фоні підвищення активності СОД встановлено достовірне зниження активності каталази ( $p < 0,05$ ). Так, у спермі бугаїв 2-ї групи активність СОД була вищою на 18 %, а активність каталази мала нижчі показники на 16 %, порівняно з даними сперми 1-ї групи. Зміни активності зазначених ферментів

супроводжуються зниженням на 12,3 год тривалості виживання спермійів. Встановлені зміни активності СОД і каталази, за нашими припущеннями, можуть бути пов'язані з явищем перехресної регуляції активності: для каталази супероксидний аніон-радикал є негативним ефектором, а  $H_2O_2$  – позитивним, для СОД – навпаки. Відтак, збільшення активності СОД може бути спричинене або збільшенням у середовищі субстрату – супероксиданіон-радикалу, який виробляється у більшій кількості в процесі окисно-відновних реакцій, або ж зменшенням концентрації продукту реакції – пероксид гідрогену, оскільки за таких умов активуються ензими, які його розщеплюють, а також інактивуються системи, що його продукують.

Таблиця 1 – Активність антиоксидантних ферментів, вміст продуктів ПОЛ та показники сперми бугаїв-плідників (M $\pm$ m, n=6)

Показник	1 група	2 група
СОД, % блокув. реакції / мг білка	4,13 $\pm$ 0,151	4,89 $\pm$ 0,322
КАТ, мкмоль / хв. х мг білка	0,178 $\pm$ 0,006	0,150 $\pm$ 0,009*
ГПО, мкмоль / хв. х мг білка	0,305 $\pm$ 0,007	0,254 $\pm$ 0,005***
Вміст МДА, нмоль/мл	1,53 $\pm$ 0,11	2,38 $\pm$ 0,16**
Об'єм еякуляту, мл	4,82 $\pm$ 0,117	3,75 $\pm$ 0,150***
Концентрація спермійів, млрд/мл	1,65 $\pm$ 0,076	1,2 $\pm$ 0,087**
Активність спермійів, балів	7,50 $\pm$ 0,224	6,30 $\pm$ 0,210
Вживання спермійів, год	97,7 $\pm$ 1,41	83,7 $\pm$ 1,75***

Примітки: різниця вірогідна при: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001.

Існує точка зору, що збільшення активності СОД пов'язане зі збільшенням аномальних спермійів [11]. Таким чином, підвищення активності СОД у спермі бугаїв зі знизеним терміном виживання можна назвати компенсаторною реакцією на збільшення інтенсивності вільнорадикального окиснення за порушення сперматогенезу. Отже, СОД підтримує баланс між супероксидом і пероксидом, впливаючи на рухливість та виживання спермійів.

Встановлені нами різнонаправлені зміни активностей СОД і каталази можуть бути зумовлені також і особливостями енергозабезпечення спермійів. Відомо, що статеві клітини для процесів життєдіяльності, поряд з анаеробним гліколізом, окислюють субстрати плазми сперми для ресинтезу АТФ, що стимулює утворення пероксидів й, відповідно, активування каталази. Разом з тим, у процесі каталітичної реакції розпад  $H_2O_2$  каталазою забезпечує додаткову кількість кисню для ефективного функціонування ланцюга дихання мітохондрій і окисного фосфорилювання [17]. Таким чином, каталазна активність у спермі сприяє поліпшенню життєздатності та підвищує виживання сперматозоїдів, що узгоджується з даними літератури [15].

Аналіз одержаних результатів свідчить, що каталазна активність у досліджених зразках сперми бугаїв позитивно корелює з активністю ГПО. Очевидно, що дія цих ферментів направлена на утилізацію жирнокислотних і ліпідних гідропероксидів, основних продуктів ПОЛ, які стимулюють вільнорадикальні реакції ліпопероксидації за ланцюговою реакцією. Проте ГПО є більш універсальною, ніж каталаза, за відношенням до субстратів, які вона може метаболізувати, тому що окрім  $H_2O_2$  ензим відновлює гідропероксиди поліненасичених жирних кислот, фосфоліпіди мембран та інші пероксидні сполуки. Тому її розглядають як основний регуляторний фермент фізіологічних рівнів активних форм Оксигену [16].

Звертає на себе увагу кореляція між низькою біологічною якістю сперматозоїдів в 2 групі (низька концентрація, загальна кількість і рухливість сперматозоїдів в еякуляті, збільшення кількості патологічних форм) зі зростанням концентрації МДА та пригніченням активності ГПО. Так, під час дослідження різних зразків сперми було виявлено зниження активності ГПО на 17 % (p<0,001) разом зі зниженням її якісних показників. Зокрема, сперма з вищою активністю ГПО характеризувалась кращими морфофункціональними показниками: збільшенням рухливості й виживання спермійів та зменшенням кількості їх патологічних форм. Отримані результати узгоджуються з існуючими уявленнями щодо ролі вільнорадикального окиснення у порушенні нормальної життєдіяльності клітин та значенням глутатіонової антиоксидантної системи в знешкодженні продуктів пероксидації [5].

З огляду на те, що в структурі активного центру ГПО є амінокислотні залишки та вільні SH-групи, які першими зазнають пероксидної дії [4], це сприяє зниженню активності ензиму.

Активність ферменту може знижуватись також за рахунок безпосередньої участі його тіолового компонента – глутатіону в процесах захисту клітини від активних форм Оксигену, відновлення пероксидних сполук та знешкодження вторинних продуктів окиснення. При цьому накопичення окисненого глутатіону зі зменшенням його відновленої форми знижує антиоксидантний захист сперматозоїдів і посилюється пошкодження фосфоліпідів мембранного бішару [12]. У свою чергу, зниження потужності глутатіонової системи може призводити до порушення процесів життєдіяльності клітини: змін вибіркової проникності клітинних мембран, активності ферментів, інтенсивності метаболізму та інших процесів.

Інтенсивність ліпідної пероксидації характеризується накопиченням МДА, який проявляє мембранотоксичний ефект і знижує фізіологічну здатність спермій. Так, вміст МДА в спермі бугаїв 2-ї групи був більшим у 1,6 рази ( $p < 0,01$ ), при чому спостерігалось зниження виживання спермій на 12 год, а їх концентрація – на 27 %. Очевидно, що в основі пошкоджуючої дії МДА є його здатність викликати модифікацію макромолекул і, як наслідок, сприяти реструктуризації біомембран, порушувати діяльність ферментних систем, пригнічувати процеси гліколізу й окисного фосфорилювання. Так, підвищення вмісту МДА в спермі бугаїв сприяло вірогідному зниженню активності ГПО на 17 %, каталази – на 16 % та погіршенню показників якості сперми: знижувалася рухливість спермій, їх концентрація, виживаність, збільшувалася кількість патологічних форм та мертвих спермій. Рівень МДА у спермі може стати інформативним біохімічним індексом якості та глибини деструктивних процесів у ній [10].

**Висновки.** У результаті проведених досліджень встановлено, що якість сперми взаємопов'язана із станом антиоксидантного захисту організму, а розлад механізмів регуляції процесів вільнорадикального окиснення ліпідів може бути одним із патогенетичних чинників порушення репродуктивної функції плідників.

Ефективність функціонування ензимної антиоксидантної системи захисту, ключовими ферментами якої є супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза, має важливе значення для збереження структурної цілісності, виживання спермій та запобігання перебігу в ній процесів ПОЛ. Доведено наявність негативної кореляційної залежності між активностями супероксиддисмутази і каталази сперми. Підвищення вмісту МДА в спермі сприяло зниженню активності антиоксидантних ферментів – каталази, глутатіонпероксидази та погіршенню показників якості сперми: знижувалася рухливість спермій, їх концентрація, виживаність, збільшувалася кількість патологічних форм та мертвих спермій.

**Перспективи подальших досліджень.** Перспективними є дослідження з визначення активності антиоксидантних ферментів і вмісту кінцевих продуктів ПОЛ у сироватці крові та встановлення їх впливу на якість нативної сперми бугаїв-плідників. Дослідження процесів ПОЛ у сироватці крові та спермі плідників дозволить своєчасно проводити корегувальну антиоксидантну терапію.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–44.
2. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В.А. Барабой, Д.А. Сутковой. – К.: Наук. думка, 1997. – С. 18–92.
3. Метод определения активности каталазы / [Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.] // Лаб. дело. – 1991. – № 12. – С. 9–10.
4. Кулинский В.И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатіонпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. 1993. – Т. 113, № 1. – С. 107–122.
5. Ушкодження ліпідів сперматозоїдів як важливий фактор патогенезу неплідності у чоловіків з олігозооспермією / [Маргіт'яч В.М., Гула М.Н., Горпинченко І.І. та ін.] // Урологія. – 2001. – № 1. – С. 44–50.
6. Моин В.М. Простой и специфический метод определения глутатіон-пероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лаб. дело. – 1986. – № 12. – С. 16–19.
7. 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.
8. Шюстя А.М. Роль активних форм кисню в регуляції сперматогенезу та заплідненні у свавців / А.М. Шюстя // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 14–22.
9. Agarwal A. Role of oxidants in male infertility rationale, significance, a treatment / A. Agarwal, R.A. Saleh // Clin. Urol. North. Am. – 2002. – Vol. 29, № 4. – P. 817–827.
10. Aitken R.J. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk / R.J. Aitken, H. Fisher // Bioassays. – 1994. – Vol. 16. – P. 259–267.

11. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function / R.J. Aitken, D.W. Buckingham, A. Carreras, D.S. Irvine // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – Vol. 21. – P. 495–504.
12. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa / [Griveau J.F., Dumont E., Renard B. et al.] // *J. Reprod. Fertil.* – 1995. – Vol. 103. – P. 17–26.
13. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury / [Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P. et al.] // *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28, № 10. – P. 1456–1462.
14. Mannervik B. Glutathione peroxidase / B. Mannervik // *Meth. in Enzym.* – 1971. – Vol. 77. – P. 13–33.
15. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa / [Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E. et al.] // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 68, № 2. – P. 204–212.
16. Rhee S.G. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling / S.G. Rhee, H.Z. Chae, K. Kim // *Free Rad. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38. – P. 1543–1552.
17. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 552. – P. 335–344.

**Влияние содержания малонового диальдегида и уровня активности ферментов антиоксидантной защиты в эякулятах быков на качество спермы**

**С.И. Цехмистренко, В.А. Коберская**

Приведенные результаты определения содержания малонового диальдегида, активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в эякулятах быков с нормальными и нарушенными показателями качества спермы. Установлено, что из-за повышенного содержания малонового диальдегида и пониженной активности каталазы и глутатионпероксидазы в сперме быков снижается подвижность, концентрация, выживание спермиев, увеличивается количество патологических форм и мертвых спермиев.

**Ключевые слова:** быки, качество спермы, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, малоновый диальдегид.

*Надійшла 3.09.2013 р.*