

УДК 577.151:636.2:591.463.1

ЦЕХМІСТРЕНКО С.І., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

КОБЕРСЬКА В.А., асистент

Вінницький національний аграрний університет

АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ЕЯКУЛЯТАХ БУГАЇВ ЗА ДОДАВАННЯ L-КАРНІТИНУ ДО РОЗРІДЖУВАЧА СПЕРМИ

Вивчали активність ферментів супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази в еякулятах бугаїв при додаванні до розбавника сперми L-карнітину та їх зв'язок із виживанням спермій. Встановлено, що активність ферментів антиоксидантного захисту з різним напрямом і силою корелює із виживанням спермій, що зумовлено біохімічними характеристиками еякулятів і особливостями окисних процесів у спермі.

Ключові слова: карнітин, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, виживання спермій.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. З метою підвищення адаптивного потенціалу сперми важливого значення набувають форми, які за рахунок внутрішніх механізмів спроможні протистояти стресовому впливу і пристосуватися до несприятливих умов без негативних змін фізіологічних параметрів. Відомо [8], що після еякуляції спермії, маючи слабкий ендоплазматичний захист, є найбільш чутливими до оксидативного стресу, який зумовлений зміною їх оточуючого середовища, аерацією, виходом у секрет еякуляту генераторів активних форм кисню (АФК), причому останні задіяні у регуляції основних функцій цієї статеві клітини [9].

У невеликих кількостях АФК необхідні для нормальної регуляції функцій сперматозоїдів, їх гіперактивації та акросомної реакції [10], але їх гіперпродукція призводить до пошкодження мембрани, зниження рухливості і порушення запліднюючої здатності спермій [1]. Крім того, вільні радикали безпосередньо пошкоджують ДНК хромосом [10] та ініціюють апоптоз сперматозоїдів [19], що призводить, в кінцевому рахунку, до безпліддя [13].

У спермі тварин функцію антиоксидантного захисту (АОЗ) виконує плазма сперми, яка вміщує значну кількість ферментних (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза) та неферментних (Glu, вітаміни С і Е) антиоксидантів [17], серед яких відмічають карнітин [3], які захищають спермії від окислювального стресу, компенсуючи нестачу ендоплазматичних ензимів [14].

Як робоча гіпотеза слугувало припущення, що ступінь виходу ферментів із сперматозоїдів залежить від споживання кисню, локалізації ферменту і міцності зв'язування його із структурами сперматозоїда, складу використовуваного середовища, режимів зберігання та ін. Оскільки в процесі технологічної обробки сперми АОЗ послаблюється, а окремі його ланки втрачаються, то дефіцит сполук із антиоксидантними властивостями можна поповнити додаванням їх у розріджувачі еякулятів. Було відмічено, що висока концентрація карнітину інгібує виведення ферментів з клітини і споживання кисню, збільшуючи виживання клітин і стабілізуючи плазматичну мембрану [12]. У зв'язку з цим, цілком логічним є використання L-карнітину, вітаміноподібної амінокислоти, що є активним метаболітом, який переносить ацильні групи у симпорті з протонами через внутрішню мембрану мітохондрій у матрикс згідно з рівнянням Ацетил-КоА + карнітин → Ацетилкарнітин + КоА, регулюючи таким чином ресинтез АТФ при β-окисненні жирних кислот, бере участь в процесах трансметилування, реакціях кон'югації з ксенобіотиками, стимулює біосинтез білка [5]. Активуючи трансферази L-карнітин сприяє клітинній дезінтоксикації, оптимізує метаболічні реакції за участю коферменту А, а також обмін глюкози та білків [15].

Метою роботи було встановлення впливу різних доз L-карнітину, що додавався до еякулятів бугаїв, на активність ферментів антиоксидантного захисту та виживанням спермій для виявлення закономірностей і уточнення механізмів регулювання окисних процесів у спермі бугаїв.

Матеріали і методи. 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» у співвідношенні 1:1. Для вивчення впливу карнітину на активність ферментів антиоксидантного захисту та

виживанням сперміїв розбавлену 1:1 сперму розділяли на частини – контрольну і три дослідні, при чому співвідношення розбавника із карнітином до попередньо розбавленого еякуляту встановлювали на рівні 3:1. Кількість доданого до розбавника L-карнітину складала 10 мг/100 мл у II групі, 30 – у III групі та 60 мг/100 мл – у IV групі.

У розбавленій спермі визначали антиоксидантний статус за рівнем активності супероксиддисмутази (СОД) [7], каталази (КАТ) [4] та глутатіонпероксидази (ГПО) [6]. Визначали також виживання сперміїв за температури 2–4 °С до припинення ними прямолінійного поступального руху (год). Статистичний аналіз отриманих результатів проведено з використанням програми Microsoft Office Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Результатами проведених досліджень доведено, що вміст L-карнітину в еякулятах бугаїв впливає на фізіологічні показники сперміїв та змінює активність досліджуваних ферментів АОЗ в спермі (табл. 1).

Таблиця 1 – Активність антиоксидантних ферментів у спермі бугаїв (M±m, n=10)

Активність ферментів	Група			
	I контрольна	II карнітину 10 мг/100 мл	III карнітину 30 мг/100 мл	IV карнітину 60 мг/100 мл
СОД, % блокування реакції / 1мг білка	3,587±0,060	2,277±0,110	2,489±0,010	3,225±0,050
Каталаза, мкмоль /мг×хв	0,165±0,003	0,207±0,091	0,202±0,006	0,176±0,002
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв×мг білка	0,075±0,001	0,107±0,002	0,104±0,001	0,111±0,002

У ході дослідження із збільшенням доз карнітину в розбавнику було відмічено і збільшення активності КАТ та ГПО, а в активності СОД прослідковувалась тенденція до зменшення. Так, активність СОД у контрольній групі була найвищою. Збільшення вмісту карнітину до рівня 10 і 30 мг/100 мл сприяло зниженню активності СОД на 36,5 і 40 % відповідно, порівняно із показником у контролі. При цьому активність вказаного ензиму в четвертій групі сперми (60 мг/100 мл) була вищою, ніж у II та III групах, відповідно на 42 та 30 %. Очевидно, що зниження активності СОД обумовлюється або збільшенням концентрації пероксиду гідрогену, оскільки за таких умов активуються ензими, які його розщеплюють, а також інактивуються системи, що його продукують, або зменшенням у середовищі субстрату – супероксиданіонрадикалу, який виробляється у меншій кількості в процесі окисно-відновних реакцій у спермі.

Одержані нами результати узгоджуються із даними літератури щодо регуляції СОД багатокомпонентною редокс-системою клітини, а також стосовно ролі інтермедіатів окисно-відновного метаболізму, який індукує синтез ензиму при збільшенні концентрації донорів електронів, або пригнічує його – в разі накопичення у клітині акцепторів [2, 18], які, очевидно, свідчать про антиоксидантні властивості карнітину, екзогенне введення якого спричиняє зменшення навантаження на СОД, можливо, від надмірного утворення супероксиданіонрадикалів при виникненні окислювального стресу. Цей факт підтверджується тим, що швидкість одноелектронного відновлення O₂ майже лінійно підвищується із збільшенням його концентрації [11].

На відміну від супероксиданіонрадикала пероксид гідрогену є більш стабільним продуктом і може легко дифундувати крізь мембрану. У клітинах надлишок пероксиду гідрогену руйнується КАТ і функцією цього ферменту є попередження нагромадження пероксиду гідрогену, який утворюється при дисмутації супероксиданіонрадикалу та при аеробному окисненні відновлених еквівалентів. Тому можна сказати, що КАТ руйнує інгібітор СОД – пероксид гідрогену, підтримуючи тим самим активність СОД на визначеному рівні і, на нашу думку, робота цих двох ферментів синхронізується в оптимальному режимі, що призводить до стійкого захисного ефекту.

Оскільки, екзогенні АФК завжди впливають на клітину тільки опосередковано через стимуляцію перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у плазматичній мембрані, тому захист від ушкодження екзогенними АФК спрямований, у першу чергу, на утилізацію жирнокислотних і ліпідних гідропероксидів – продуктів ПОЛ, що стимулюють вільнорадикальні реакції

ліпопероксидації за принципом ланцюгової реакції. Основна роль у цьому процесі належить ГПО та КАТ. Аналіз одержаних результатів свідчить, що каталазна активність сперми бугаїв позитивно корелює із активністю ГПО. Зокрема, активність КАТ та ГПО в розбавленій спермі із концентрацією карнітину 10 мг/100 мл була відповідно на 25 і 42 % вищою, а у III групі сперми (30 мг/100 мл) – мала збільшення на 22 і 39 %, порівняно із контролем. Динаміка активності вищевказаних ферментів мала незначне розходження у IV групі сперми, де активність КАТ, порівняно із даними попередньої III групи показала зниження на 13 %, а активність ГПО – підвищення на 9 %.

Відомо, що КАТ, також як і ГПО, каталізують одну і ту саму реакцію – відновлення пероксиду гідрогену до води і молекулярного кисню, але у цих двох ферментів є специфічні домени і характерні особливості дії. Каталаза, що є пероксисомальним ферментом, руйнує виключно тільки пероксид гідрогену і активується, коли клітинні концентрації H_2O_2 будуть набагато вищі за фізіологічні рівні, під час так званого окислювального спалаху. ГПО здійснює регулювання малих фізіологічних концентрацій H_2O_2 і у внутріклітинних та позаклітинних компартментах. ГПО – більш універсальна, ніж КАТ, за відношенням до субстратів, які вона метаболізує, тому що, окрім H_2O_2 , відновлює гідропероксиди поліненасичених жирних кислот, фосfolіпідів мембран та інші пероксидні сполуки. Тому її розглядають як основний регуляторний фермент фізіологічних рівнів АФК [16].

Висновки з проведеної роботи було зроблено за результатами виживання спермій за температури 2–4 °С, яке мало вищі показники у II та III групах на 13 та 21 % відповідно, порівняно із виживанням у контрольній групі. Проте виживання спермій у IV групі були нижчим на 9 %, порівняно із контролем. Таким чином, L-карнітин бере участь у нормалізації клітинного метаболізму в умовах розвитку окислювального стресу, тому, очевидно, за його дії покращується використання субстратів середовища і знижується споживання кисню клітинами, що і проявляє захисну дію. Антиоксидантна дія L-карнітину пов'язана з його здатністю підсилювати виробництво АТФ, що підвищує загальний рівень і активність антиоксидантних ферментів.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено, що ефективність функціонування ензимної антиоксидантної системи захисту, ключовими ферментами якої є супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза, має важливе значення для збереження структурної цілісності й виживання спермій. Досліджувані дози карнітину в спермі виконували роль ефекторів (активаторів чи інгібіторів) ферментів, причому ефект дії залежав від дози введеної добавки. Екзогенне введення карнітину спричиняє зменшення навантаження на супероксиддисмутазу, очевидно, від надмірного утворення супероксиданіонрадикалів у разі виникнення окислювального стресу, та активує каталазу й глутатіонпероксидазу. Загалом, визначено оптимальну дозу введення L-карнітину до розбавника сперми бугаїв, що становить 30 мг карнітину на 100 мл розбавника або його концентрація 0,25 мг/мл сперми, за якої відбувається нормалізації клітинного метаболізму в умовах розвитку окислювального стресу, що збільшує виживання спермій.

Перспективи подальших досліджень – провести апробацію дії L-карнітину на інші біохімічні показники сперми бугаїв та визначити економічну ефективність його застосування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Громенко Д.С. Применение наукоемких технологий для оценки фертильности мужчин / Д.С. Громенко // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15. – № 4. – С. 118–120.
2. Карпенко Н.О. Вплив антиоксидантної терапії на характеристики про- та антиоксидантного балансу сім'яної рідини чоловіків з гіпофертильністю невизначеного генезу / Н.О. Карпенко, В.О. Бондаренко, Н.С. Кавок // Здоров'є людини. – 2007. – № 2. – С. 172–174.
3. Кондратова Ю.А. Порівняльний аналіз якості сперми та вмісту L-карнітину, фруктози, цинку і аскорбату в сім'яній рідині чоловіків з різних регіонів України / Ю.А. Кондратова, А.В. Клепко, С.В. Андрейченко // Фізика живого. – Т. 18, № 3. – 2010. – С. 70–74.
4. 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.
5. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т. 1. – 385 с.
6. Моин В.М. Простой и специфический метод определения глутатинпероксидазы 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. Agarval A. Prevention of oxidative stress injury to sperm / A. Agarval, S.A. Prabakaran, T.M. Said // *Journal of Andrology*. 2005. – V. 26. – N. 6. – P. 654–660.
9. Aitken R.J. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa / R.J. Aitken, J.S. Clarkson // *J. Reprod. Fertil.* – 1987. – V. 81. – P. 459–469.
10. Aitken R.J. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa / R.J. Aitken, E. Gordon, D. Harkiss et al. // *Biol. Reprod.* – 1998. – V. 59. – P. 1037–1046.
11. Boveris A. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen / A. Boveris, B. Chance // *Biochem. J.* – 1973. – V. 134. – № 3. – P. 707–716.
12. Jenkins D.L. Antiketogenic and hypoglycemic effects of aminocarnitine and acylaminocarnitines / D.L. Jenkins, O.W. Griffith // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 1986 January. – 83(2). – P. 290–294.
13. Loft S. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy / S. Loft, T. Kold-Jensen, N.H. Hjøllund // *Hum. Reprod.* – 2003. – V. 18. – N 6. – P. 1265–1272.
14. Potts R.J. Mutation Research / R.J. Potts, L.J. Notarianni, T.M. Jefferies // *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2000. – 447, N 214. – P. 249–256.
15. Rebouche C.J. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu. Rev. Nutr.* / C.J. Rebouche, H. Seim // *Rev. Nutr.* – 1998. – N 18. – P. 39–61.
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 Radic Biol Med.* – 2005. – Vol. 38. – P. 1543–1552.
17. Saleh R. A., Agarwal A. // *J. Androl.* – 2002. – 23, N 6. – P. 737–752.
18. Vanacker H., Sandalio L., Jimenez A. et al. // *Ibid.* – 2006. – 57, N 8. – P. 1747–1758.
19. Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa / J. Villegas, M. Schulz, L. Soto et al. // *Fertil. Steril.* – 2005. – V. 83. – P. 808–810.

Активность ферментов антиоксидантной защиты в эякуляте быков при добавлении L-карнитина к разбавителю спермы

С.И. Цехмистренко, В.А. Коберская

Изучали активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в эякуляте быков при добавлении к разбавителю спермы L-карнитина и их связь с выживанием спермиев. Установлено, что активность ферментов антиоксидантной защиты с разным направлением и силой коррелируют с выживанием спермиев, что обусловлено биохимическими характеристиками эякулятов и особенностями окислительных процессов в сперме.

Ключевые слова: карнитин, супероксиддисмутазы, каталаза, глутатионпероксидаза, выживание спермиев.

The activity of antioxidant enzyme in the ejaculates for adding l-carnitine to diluent semen

S. Tsekhmistrenko, V. Koberska

We studied the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in bull ejaculate when added to semen L-carnitine and their relation to the survival of sperm. Found that the activity of antioxidant enzymes with different direction and strength correlates with survival of sperm, due to biochemical characteristics of ejaculate characteristics and oxidative processes in semen.

Key words: carnitine, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, survival of sperm.