

УДК 636.4.082.453.52

ЦЕХМІСТРЕНКО С.І., д-р с.-г. наук

ПОЛІЩУК С.А., аспірант

ПОЛІЩУК В.М., канд. с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ОСОБЛИВОСТІ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У СПЕРМІ КНУРІВ-ПЛІДНИКІВ

Наведені дані щодо дослідження пероксидного окиснення ліпідів у плазмі сперми та спермоцитоплазмі чистопородних кнурів-плідників великої білої породи та синтетичної лінії SS23. Встановлено, що вміст продуктів ліпопероксидації (дієнові кон'югати та гідрпероксиди) в спермоцитоплазмі вищий порівняно із плазмою сперми. Активність каталази вища у плазмі порівняно з внутрішньоклітинним рівнем.

Ключові слова: кнурі-плідники, сперма, спермоцитоплазма, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Дослідження останніх років показали, що репродуктивна система самців, є однією з найбільш чутливих та вразливих в організмі. Вона піддається впливу низки несприятливих факторів, які, впливаючи на ендокринні залози, центральну нервову систему і безпосередньо на гонади, зумовлюють дистрофічні зміни в каналцях і сполучній тканині сім'яників. Це призводить до зниження запліднювальної здатності еякуляту і, як наслідок, до порушення репродукції (безпліддя, народження неповноцінного молодняка) [2, 10].

Особлива увага приділяється впливу вільнорадикального окиснення на статеву функцію самців. З одного боку надлишок вільних радикалів і зумовлений ними оксидативний стрес може негативно впливати на сперматогенез, з іншого – нормальне функціонування сперміїв потребує незначної кількості активних форм Оксигену (АФО) [8].

Доведено, що гіперактивація сперміїв та їх акросомна реакція відбувається тільки за присутності кисневих радикалів. Лейкоцити разом зі сперміями є основними продуцентами АФО у спермі [1]. Однак, функціональна роль АФО у спермі багато в чому залишається не з'ясованою.

Оксидативний стрес є наслідком дисбалансу між утворенням АФО та діяльністю антиоксидантної системи. Залежно від концентрації АФО проявляють регуляторну чи токсичну дію. У сперміїв найчутливішими до окислювального пошкодження є плазматичні мембрани, що вкривають акросому та хвіст (містять велику кількість ненасичених жирних кислот) і цитоплазма в якій низька концентрація антиоксидантних ферментів [7].

Стан антиоксидантної системи у тварин впливає на їх продуктивність, резистентність та якість продукції. На інтенсивність утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи захисту впливає вид, порода, стать, вік, умови годівлі та утримання, стрес тощо [2].

Вивчення особливостей функціонування статевих клітин кнурів-плідників, які відіграють вирішальну роль у здійсненні репродуктивної функції, набуває особливої актуальності в сучасних умовах.

Метою досліджень було визначення інтенсивності прероксидного окиснення ліпідів у плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів-плідників, що є важливим маркером для оцінки функціонального стану статевих клітин.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 16 кнурях НДГ ТОВ «Еліта». Матеріалом слугувала сперма, яку одержували мануальним способом від 8 чистопорідних кнурів великої білої породи та 8 кнурів синтетичної лінії SS23. Плазму сперми відділяли шляхом центрифугування (3000 об./хв 10 хв), а статеві клітини дворазово відмивали у фізіологічному розчині. Руйнування здійснювали за допомогою диференційного центрифугування з використанням швидкісної рефрижераторної центрифуги (14000 g/хв протягом 10 хв).

Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази (КАТ) [3] та супероксиддисмутази (СОД) [6] за вмістом церулоплазміну (ЦП) [9]. Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) [5], гідрпероксидів

ліпідів (ГПЛ) [4] і ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1]. Результати дослідження обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента, та з використанням пакету прикладних програм для обробки медичної та біологічної інформації Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США).

Результати досліджень та їх обговорення. Активні форми Оксигену є проміжними продуктами аеробного метаболізму, інтенсивність їх утворення у клітинах залежить від фізіологічного стану організму та дії чинників зовнішнього середовища, тому співвідношення між вільнорадикальним пероксидним окисненням і системою антиоксидантного захисту збалансоване.

У результаті проведених досліджень встановлено, що інтенсивність вільнорадикального окиснення ліпідів у плазмі сперми кнурів має певні особливості (табл. 1).

Таблиця 1 – Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів у плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів-плідників (M±m; n=8)

Показник	Чистопорідні кнури-плідники великої білої породи		Синтетична лінія SS23	
	плазма	спермоцитоплазма	плазма	спермоцитоплазма
ГПЛ, ум.од./мл	3,29 ± 0,11	7,57 ± 0,29	2,94 ± 0,14	6,92 ± 0,30
ДК, ум.од./мл	0,19 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,80 ± 0,04*
ТБК-АП, нмоль/мл	3,54 ± 0,20	3,44 ± 0,23	3,79 ± 0,22	2,80 ± 0,13*
Фактор АОС	111,31 ± 4,66	64,94 ± 4,23	61,15 ± 5,13*	65,66 ± 6,37

Примітка: різниця достовірна відносно чистопорідних кнурів-плідників при * – $p < 0,05$.

Концентрація дієнових кон'югатів у спермоцитоплазмі кнурів синтетичної лінії SS23 була достовірно вищою, натомість рівень ТБК-активних продуктів нижчим ($p < 0,05$) порівняно з показниками чистопорідних кнурів. Вірогідних змін, щодо концентрації гідропероксидів ліпідів у спермі чистопорідних кнурів та синтетичної лінії не виявлено. Більшість науковців вважають, що рухливість і патологічні зміни у сперміях тісно пов'язані з пероксидацією ліпідів, рівень ТБК-АП є інформативним біохімічним індексом її якості. Показник фактора антиоксидантного стану плазми сперми чистопорідних кнурів вищий (у 1,8 рази) порівняно зі самцями синтетичної лінії SS23.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили із використанням статистичного пакету (Statistica 6.0 StatSoftInc, США) та врахуванням параметричних та непараметричних даних.

Результати статистичної обробки первинних даних, які представлені у таблицях 2,3 свідчать, що середній вміст первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації в спермоцитоплазмі вищий порівняно з показниками плазми сперми. І це зрозуміло, адже у плазмі сперми активність антиоксидантних ферментів вища. Мінливість первинних і вторинних продуктів ПОЛ у плазмі сперми значно нижча проти аналогічних показників у спермоцитоплазмі.

Таблиця 2 – Статистичні дані вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів у спермі кнурів великої білої породи

Показник	Чистопорідні кнури-плідники великої білої					
	ГПЛ		ДК		ТБК-АП	
	плазма	спермоци-топлазма	плазма	спермоци-топлазма	плазма	спермоци-топлазма
Min	2,75	6,72	0,1	0,22	2,82	2,73
Max	3,71	8,77	0,24	0,42	4,61	4,62
Діапазон (розмах варіації)	0,96	2,05	0,14	0,2	1,79	1,88
Дисперсія	0,10	0,66	0,002	0,004	0,33	0,44
Середнє відхилення	0,32	0,81	0,04	0,06	0,57	0,66
Коефіцієнт варіації	0,09	0,11	0,24	0,19	0,16	0,19
Асиметрія	-0,23	0,44	-0,58	0,09	0,75	0,86
Ексцес	2,19	1,56	2,71	2,63	2,63	2,33
Медіана	3,31	7,31	0,19	0,32	3,33	3,25
Критерій Шапіро-Уїлка	0,97	0,88	0,96	0,98	0,93	0,86

Концентрація продуктів пероксидного окиснення ліпідів у спермоцитоплазмі обох груп вища проти показників плазми.

Високий вміст ТБК-АП у плазмі сперми зумовлює достатньо високе середнє значення цього показника під час досліджень. Цей показник плазми сперми є найбільш мінливим. За

коефіцієнтом мінливості вміст ТБК-АП поступається тільки ДК у плазмі сперми чистопорідних кнурів.

Таким чином, сперма кнурів-плідників характеризується достатньо високим рівнем ліпопероксидації, що, ймовірно, пояснюється фізіологічними функціями сперми.

Таблиця 3 – Статистичні дані вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів у спермі кнурів синтетичної лінії SS23

Показник	Синтетична лінія SS23					
	ГПЛ		ДК		ТБК-АП	
	плазма	спермоцитоплазма	плазма	спермоцитоплазма	плазма	спермоцитоплазма
Мін	2,26	5,76	0,18	0,66	3,08	2,05
Мах	3,63	8,52	0,26	0,98	4,53	3,25
Діапазон (розмах варіації)	1,37	2,76	0,08	0,32	1,45	1,19
Дисперсія	0,17	0,73	0,001	0,02	3,78	0,14
Середнє відхилення	0,41	0,85	0,03	0,14	1,94	0,37
Коефіцієнт варіації	0,14	0,12	0,14	0,15	0,16	0,13
Асиметрія	0,11	0,64	-0,13	0,23	0,02	-0,85
Екссес	2,58	2,72	1,55	1,62	1,31	3,01
Медіана	2,84	6,79	0,23	0,78	3,72	2,82
Критерій Шапіро-Уїлка	0,96	0,96	0,90	0,93	0,86	0,92

З даних обрахунків видно, що дисперсія та середнє відхилення значно вищі у плазмі сперми кнурів синтетичної лінії, що характеризує значне відхилення показників ряду розподілу від середнього арифметичного. Коефіцієнт варіації показників групи кнурів синтетичної лінії SS23 майже не відрізняється, що означає сталість показників досліджень.

Антиоксидантна система захищає клітини від деструктивної дії продуктів вільнорадикального окиснення. Вона контролює інтенсивність утворення радикалів і знешкоджує утворені продукти ліпопероксидації, підтримує баланс між утворенням і утилізацією продуктів ПОЛ.

Основними антиоксидантними ферментами сперміїв є супероксиддисмутаза та каталаза (табл.4).

Таблиця 4 – Активність ферментів системи антиоксидантного захисту та вміст церулоплазміну в плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів-плідників (M±m; n=8)

Показник	Чистопорідні кнури-плідники великої білої породи		Синтетична лінія SS23	
	плазма	спермоцитоплазма	плазма	спермоцитоплазма
СОД, ум. од. /мл	0,99 ± 0,04	1,18 ± 0,06	1,06 ± 0,06	0,99 ± 0,05*
КАТ, мкат /мл	395,60 ± 16,31	189,14 ± 15,10	217,78 ± 15,77*	182,48 ± 7,91
ЦП, мкг /мл	72,63 ± 2,45	185,06 ± 9,71	73,50 ± 2,68	170,28 ± 11,89

Однак, спермії мають надзвичайно малий цитоплазматичний простір для дії ферментів [2], тому не можуть протидіяти оксидативному пошкодженню. Цю функцію виконують антиоксиданти насінневої плазми, що є головним антиоксидантним джерелом у спермі [10]. Плазма сперми містить СОД, КАТ, які виробляються простотою та додатковими залозами.

Активність супероксиддисмутази у спермоцитоплазмі чистопорідних кнурів вища на 16,1 %. Каталазна активність у плазмі сперми кнурів синтетичної лінії SS 23 нижча на 45 % (p<0,05). Значну роль у процесах ПОЛ відіграє специфічний білок – церулоплазмін. Він є основним поза-клітинним антиоксидантом, який інгібує ПОЛ за рахунок „перехвату” та інактивації супероксидного аніон-радикалу. Концентрація церулоплазміну в плазмі сперми та спермоцитоплазмі кнурів обох порід була приблизно на однаковому рівні.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Підсумовуючи, можна зазначити, що процеси вільнорадикального окиснення у спермі здорових тварин характеризуються стабільним рівнем активності, що є необхідною передумовою для нормального перебігу процесів, зв'язаних з репродуктивною функцією. Перспектива – використання препарату.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобаобитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–44.
2. Божедомов В.А. Причины оксидативного стресса сперматозоидов // В.А. Божедомов, Д.С. Громенко, И.В. Ушакова // Проблемы репродукции, 2008. – № 6, С. 67–73.
3. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, А.И. Иванова, И.Т. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
4. Романова Л.А. Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония / Л.А. Романова, И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии; под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 64–66.
5. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии; под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.
6. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
7. Kartikeya Makker Oxidative stress & male infertility Indian / Kartikeya Makker, Ashok Agarwal & Rakesh Sharma // J. Med. Res. – 129, V. 4. – 2009. – P. 357–367.
8. O'Flaherty C. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner / C. O'Flaherty, A. Souza // Biol. Reprod. – 2011 Feb. – V. 84(2). – P. 238–247.
9. Ravin H.A. Secretion of digestive enzyme by pancreas with minimal transit tissue / H.A. Ravin // J. Lab. Clin. Med. – 1961. – V. 58. – P. 161–168.
10. Saalu L. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation / L. Saalu // Pak. J. Biol. Sci. – 2010. V. 13(9). – P. 413–422.

Особенности свободнорадикальных процессов в сперме хряков-производителей

С.И. Цехмистренко, С.А. Полищук, В.Н. Полищук

Представлены данные по исследованию пероксидного окисления липидов в плазме спермы и спермоцитоплазме чистопородных хряков-производителей крупной белой породы и синтетической линии SS23. Установлено, что содержание продуктов липопероксидации (диеновые конъюгаты и гидропероксиды) в спермоцитоплазме выше по сравнению с плазмой спермы. Активность каталазы выше в плазме спермы по сравнению с внутриклеточным содержанием.

Ключевые слова: хряки-производители, сперма, спермоцитоплазма, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система.

Features of free radical processes in the sperm breeding boars

S. Tsekhmistrenko, S. Polischuk, V. Polischuk

The article is devoted to study of lipid peroxidation in plasma and sperm spermoцитоплазме thoroughbred breeding boars of large white breed and synthetic line SS23. It is established, that the content of lipid peroxidation products in spermoцитоплазме higher than plasma sperm. Catalase activity was higher in the plasma compared with the intracellular contents.

Keywords: breeding boars, sperm, spermoцитоплазма, lipid peroxidation, antioxidant system.