



УДК 577.1:611.013.11/57.042

## ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ СІМ'ЯНОЇ РІДИНИ СПЕРМИ КРОЛІВ

Кондратова Ю.А.

ДУ „Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, Київ, Україна  
e-mail: jka@ukr.net

Надійшла до редакції 10.01.2011

Досліджено кількісні характеристики неферментативної антиоксидантної системи в сім'яній рідині сперми кролів за умов тотального опромінення тварин рентгенівськими променями в дозах 0,1, 0,5, і 2,0 Гр. Показано, що на 10 добу після опромінення збільшення дозового навантаження на тварин до 2,0 Гр призводить до суттєвих змін у вмісті неферментативних антиоксидантів і посиленню процесів перекисного окиснення ліпідів в сім'яній рідині сперми кролів. Через 3 місяці після опромінення відбувається нормалізація антиоксидантної активності і рівня ПОЛ в сім'яній рідині.

**Ключові слова:** сім'яна рідина, глутатіон, антиоксидантна активність, вільні тіолові групи, перекисне окиснення ліпідів.

### ВСТУП

Відомо, що сперма тварин містить органічні речовини, що можуть ефективно перехоплювати і знешкоджувати реактивні форми кисню (РФК), зокрема супероксидні та гідроксильні радикали, а також пероксид водню. До сполук антиоксидантної спрямованості головним чином належать токофероли з сімейства вітаміну Е, аскорбат, сечова кислота, а також вільні тіоли. Останні в більшості випадків представлені глутатіоном (L-γ-глутамін-L-цистеїнгліцином), гомоцистеїном, цистеїнілгліцином [1]. Антиоксидантні сполуки, крім аскорбату, що не продукується звичайним біохімічним шляхом в організмі людини, морських свинок, мавп, деяких птахів і риб, синтезуються в організмі людини і тварин і тому не потребують обов'язкового надходження з їжею [2].

Присутність антиоксидантів в спермі є дуже важливим фактором для збереження інтегральної цілісності сперматозоїдів, їх рухливості та здатності до взаємодії з яйцеклітиною. Так, токофероли і аскорбат запобігають руйнуванню подвійних зв'язків в ненасичених жирних кислотах, що у великій кількості сконцентровані в мембранах сперматозоїдів. В той же час, вільні тіоли, особливо цистеїн, сприяють відновленню дисульфідних зв'язків і утворенню сульфгідрильних груп в структурі нуклеопротамінового комплексу, що полегшує деконденсацію хроматину при утворенні чоловічого пронуклеусу в ооциті II [3]. В свою чергу, глутатіон (GSH), як кофермент глутатіонпероксидази, нейтралізує пероксид водню, що утворюється в

результаті знешкодження супероксидних радикалів супероксиддисмутазою, перетворюючись в глутатіоновий дисульфід (GSSG). Відновлення окисненого глутатіону здійснюється глутатіонредуктазою за допомогою НАДФН. Крім того, відновлений глутатіон утворюється також і з L-глутамату шляхом послідовного ферментативного приєднання двох залишків амінокислот цистеїну і гліцину [4]. Потреба в існуванні системи надійного захисту від РФК в спермі зумовлена тим, що сперматозоїди стають мішенню для атаки як РФК, що продукуються спермальними лейкоцитами, так і РФК самих сперматозоїдів, що утворюються під дією оксидази голівки за умов гіперактивації та акросомної реакції, а також при функціонуванні електронтранспортного ланцюга мітохондрій [5].

Метою дослідження було визначення кількісних характеристик антиоксидантної системи в сім'яній рідині сперми кролів за умов тотального опромінення тварин рентгенівськими променями в різних дозах.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В досліді використовували білих кролів розводки місцевого віварію. Тварини утримувались у окремих клітках в контрольованих умовах, а саме при температурі повітря 16-22° С, світловому дні в 16 годин і освітленості в 38 лк, а також на стандартному раціоні. Збір сперми проводили за допомогою штучної вагіни. Відокремлення сім'яної рідини від сперматозоїдів та сім'яних везикул проводили центрифугуванням при 2500 г 12 хв.

Визначення загальної антиоксидантної активності в сім'яній рідині проводили за допомогою 2,2'-азинобіс-3-етилбензотіозолін 6-сульфонату (АБТС), котрий у катіонній формі приєднується до антиоксидантів, змінюючи при цьому величину поглинання світла на довжині хвилі 734 нм [6]. До кожної проби додавали суміш, що складалась з 2,5 мкМ метміоглобіну і 0,15 мМ АБТС у фосфатному буфері на фізіологічному розчині. Запуск реакції проводили пероксидом водню  $H_2O_2$  при температурі 30° С. Через 2 хв. 45 с суміш переносили у спектрофотометричні кювети і вимірювали оптичне поглинання при 734 нм. Стандартні калібровочні криві будували для антиоксиданту тролокса у фосфатному буфері на фізіологічному розчині.

Визначення вмісту, як відновленого, так і окисненого глутатіону в сім'яній рідині проводили за допомогою 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБ) та НАДФН [7]. При визначенні GSH його спочатку окиснювали за допомогою ДТНБ у GSSG, а потім GSSG відновлювали глутатіон-редуктазою до GSH за участі НАДФН. При аналізі вмісту GSSG в сім'яній рідині реакцію окиснення GSH у GSSG нейтралізували за допомогою 2-винілпиридину при 25° С протягом 1 години. В процесі окиснення утворювалась 2-нітро-5-тіобензойная кислота, котру визначали спектрофотометрично на довжині хвилі 412 нм. Для побудови стандартних кривих використовували розчин GSH.

Кількісний аналіз загального вмісту тіолових груп у сім'яній рідині здійснювали відповідно до методики [8]. За протоколом, до аліквоти проби додавали реакційну суміш, що складалась з 2,2-дитіобіснітробензойної кислоти у трис-буфері (рН 8,2) з  $Na_2EDTA$  та абсолютним метанолом. Розчин, що утворювався, спочатку перемішували на автоматичній мішалці "Vortex" (Росія), а потім залишали відстоятись 20 хв. при кімнатній температурі. Згодом розчин центрифугували при 3500 g 10 хв. Оптичну густину прозорого супернатанту вимірювали на 412 нм. Стандартні калібровочні криві будували для розчинів GSH у дистильованій воді.

Рівень пероксидації ліпідів у сім'яній рідині вимірювали шляхом визначення активних продуктів тіобарбітурової кислоти [9]. Для цього до 1 мл сім'яної рідини додавали 2 мл реагенту, що складався з 15% трихлороцтової кислоти (w/v), 0,375% тіобарбітурової кислоти (w/v) і 0,25н соляної кислоти. Кінцеву суміш нагрівали до 100° С і тримали так 15 хв. Після охолодження преципітат відокремлювали центрифугуванням при 1000 g протягом 10 хв. Світлооптичне поглинання супернатанту визначали на 535 нм проти дистильованої води. Концентрацію ТБК-активних продуктів підраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції маленового альдегіду, що дорівнює  $1,56 \times 10^5$  М/см.

Опромінення тварин проводили на установці „РУМ-17” (Росія) рентгенівськими променями в дозах

0,1, 0,5, і 2,0 Гр. Після опромінення сперму збирали на 10 добу і через 3 місяці.

*Статистичний аналіз.* Порівняння даних для різних груп кролів проводили із застосуванням дисперсійного аналізу "ANOVA" та непарного теста Стьюдента з поправкою Бонфероні. Довірчі інтервали для середніх значень визначали за допомогою t-критерію при  $p=0,95$  на підставі підрахунку стандартної похибки. Основу статистичної обробки склали двобічні криві розподілу випадкових даних. Відмінності вважали статистично значущими при  $p<0,05$  [10].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведеними дослідженнями було встановлено, що на 10 добу після опромінення збільшення дозового навантаження на тварин призводить до суттєвого збільшення концентрації відновленого глутатіону в сім'яній рідині (табл. 1). Так, при дозі в 0,1 Гр вміст GSH в сім'яній плазмі підвищився майже в 2 рази, а при 0,5 і 2,0 Гр, відповідно, в 2,4 і 2,7 рази. Одночасно рівень окисненого глутатіону з підвищенням дози тотального опромінення тварин теж виявив тенденцію до зростання, яке відбувалось більш виражено при дозах в 0,5 та 2,0 Гр. Так, вміст GSSG в першому випадку зріс в 6 разів, а в другому – майже в 24 рази. Ці дані вказують на появу дефіциту відновлених еквівалентів при дозі в 2,0 Гр. Дійсно, порівняно з контролем загальна антиоксидантна активність (ЗАО) в сім'яній плазмі при вказаній дозі тотального опромінення зменшилась до 75 % від контрольних значень, а вміст вільних тіолових груп – до 67 %. Одночасно вміст ТБК-активних продуктів збільшився, що вказує на посилення процесів перекисного окиснення ліпідів в спермі. При дозі в 0,1 Гр ЗАО в сім'яній плазмі, на відміну від дози в 2,0 Гр, збільшилась, сягнувши рівня 127 % від контролю, тоді як при дозі в 0,5 Гр спостерігалось лише невелике зменшення ЗАО на 0,08 мкМ. Збільшення концентрації GSH і зростання ЗАО при дозі в 0,1 Гр супроводжувалось як збільшенням вмісту вільних тіолових груп в сім'яній плазмі в 1,4 рази, так і пригніченням ПОЛ в перерахунку на ТБК-активні продукти до 84 % контрольної величини. При дозі в 0,5 Гр вміст вільних тіолів на 10 добу після опромінення зменшився на 5 % порівняно з контролем, тоді як, вміст ТБК-активних продуктів, у свою чергу, зріс на 7 %.

Подальші дослідження виявили, що збільшення тривалості пострадіаційного періоду до 3-х місяців призводило до поступової нормалізації антиоксидантної активності сім'яної рідини і спадання ПОЛ (табл. 2). Так, при дозі в 2,0 Гр вміст ТБК-активних продуктів, порівняно з періодом 10 діб після опромінення, знизився на 10%, а ЗАО і вміст вільних тіолів, навпаки, зросли на 13 % та 17 %, відповідно. В той же час загальний вміст глутатіону в сім'яній рідині також впав з 6,02 мкМ до 4,31 мкМ,

що супроводжувалось одночасним зменшенням співвідношення ГССГ/ ГSH з 0,12 до 0,08. При дозі в 0,5 Гр посилення відновлювальних тенденцій набувало більш помітного прояву, що призвело до наближення показників ПОЛ, ЗАО та вмісту вільних тіолів майже до контрольного рівню. Однак рівень ГSH та ГССГ в сім'яній плазмі залишався вищим за

контроль в 1,7 та 3,6 рази, відповідно. При дозі в 0,1 Гр на 90 добу після опромінення загальний вміст глутатіону в сім'яній плазмі складав 129 % контрольної величини. Висока концентрація вільних тіолів і послаблення ЗАО в цей період явно сприяли суттєвому зниженню ПОЛ, яке знаходилось на рівні 85 % контролю.

Таблиця 1

**Вміст антиоксидантів, окисненого глутатіону і ТБК-активних продуктів у сім'яній рідині сперми кролів до і на 10 добу після опромінення рентгенівськими променями**

Параметр, мкМ	Доза опромінення			
	0 Гр (контроль)	0,1 Гр	0,5 Гр	2,0 Гр
Глутатіон відновлений	2,23±0,15	4,34±0,28*	5,27±0,72*	6,02±0,64*
Глутатіон окиснений	0,037±0,01	0,06±0,02	0,18±0,06*	0,73±0,12*
Загальна антиоксидантна активність	422,17±78,13	538,12±69,22	414,38±53,80	317,81±47,34
Вміст ТБК-активних продуктів	5,87±1,10	4,94±0,87	6,31±1,48	8,04±2,77
Вміст вільних тіолів	110,60±18,36	154,78±25,49*	105,31±17,57	73,96±10,13*

\* – статистичні відмінності від контролю при < 0,05

Таблиця 2

**Вміст антиоксидантів, окисненого глутатіону і ТБК-активних продуктів у сім'яній рідині сперми кролів до і через 3 місяці після опромінення рентгенівськими променями**

Параметр, мкМ	Доза опромінення			
	0 Гр (контроль)	0,1 Гр	0,5 Гр	2,0 Гр
Глутатіон відновлений	2,14±0,08	2,77±0,21*	3,62±0,44*	4,31±0,54*
Глутатіон окиснений	0,03±0,01	0,04±0,01	0,11±0,05*	0,37±0,09*
Загальна антиоксидантна активність	417,17±54,16	465,44±51,85	410,56±39,72	359,33±27,11
Вміст ТБК-активних продуктів	5,92±0,88	5,06±0,91	5,73±0,74	7,25±1,05
Вміст вільних тіолів	102,31±13,98	131,66±14,51*	101,49±10,37	86,37±9,16

\* – статистичні відмінності від контролю при < 0,05

## ВИСНОВКИ

1. На 10 добу після опромінення збільшення дозового навантаження на тварин призводить до суттєвого збільшення концентрації відновленого та окисненого глутатіону в сім'яній рідині з появою дефіциту відновлених еквівалентів при дозі в 2,0 Гр. За такої дози тотального опромінення загальна антиоксидантна активність в сім'яній плазмі зменшилась до 75 % від контрольних значень, а вміст вільних тіолових груп – до 67 %; тоді як вміст ТБК-активних продуктів збільшився, що вказує на посилення процесів перекисного окиснення ліпідів в спермі.

2. На 10 добу після тотального опромінення кролів в дозі 0,1 Гр збільшення концентрації ГSH і зростання загальної антиоксидантної активності в сім'яній плазмі супроводжувалось як збільшенням вмісту

вільних тіолових груп в сім'яній плазмі, так і пригніченням ПОЛ. При опроміненні дозою 0,5 Гр спостерігались лише невеликі зміни загальної антиоксидантної активності, вмісту тіолових груп і ТБК-активних продуктів.

3. Збільшення тривалості пострадіаційного періоду після тотального опромінення кролів до 3-х місяців призводило до нормалізації антиоксидантної активності і рівня перекисного окиснення ліпідів в сім'яній рідині.

## Література

1. *Ebisch I.M.W., Peters W.H.M., Thomas C.M.G. [et al.]. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple // Human reproduction. – 2006. – Vol. 21, № 7. – P. 1725-1733.*

2. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*. – 3rd edition. N.Y. // Worth Publisher. – 2000. – 1268 p.
3. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes // *Reproductive biology*. – 2005. – Vol. 5, № 1. – P. 5-17.
4. Drevet G.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2006. – Vol. 250. – P. 70-79.
5. Lamirande E., O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen and kinases // *Biochemica and biophysica acta*. – 2008. – Vol. 1784. – P. 106-115.
6. Rice-Evans C., Miller N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 234. – P. 279-293.
7. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples // *Method Enzymol.* – 1985. – Vol. 113. – P. 548-555.
8. Hu M.L. Measurement of protein free sulphhydryl groups and glutathione in plasma // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 223. – P. 380-385.
9. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* – 1978. – Vol. 52. – P. 302-310.
10. Bland M. *An introduction to medical statistics*. 3<sup>rd</sup> editor. – Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. – 405p.

---

## ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ СПЕРМЫ КРОЛЕЙ

Кондратова Ю.А.

Изучены количественные характеристики неферментативной антиоксидантной системы в семенной жидкости спермы кролей при тотальном облучении животных рентгеновскими лучами в дозах 0,1, 0,5, и 2,0 Гр. Показано, что на 10 сутки после облучения увеличение дозовой нагрузки на животных до 2,0 Гр приводит к существенным изменениям содержания неферментативных антиоксидантов и усилению процессов перекисного окисления липидов в семенной жидкости спермы кролей. Через 3 месяца после облучения наблюдается нормализация антиоксидантной активности и уровня ПОЛ в семенной жидкости.

**Ключевые слова:** семенная жидкость, глутатион, антиоксидантная активность, свободные тиоловые группы, перекисное окисление липидов.

---

## IMPACT OF IONIZING RADIATION ON THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SEMINAL PLASMA OF RABBIT SPERM

Kondratova Yu.A.

Quantitative characteristics of non-enzymatic antioxidant system of seminal plasma of rabbit sperm in conditions of whole body X- irradiation in doses 0.1, 0.5 and 2.0 Gy were studied. It was shown that of dose increase to 2.0 Gy leads to serious changes in contents of non-enzymatic antioxidants and enhancing of lipid peroxidation in seminal plasma of rabbit sperm on the 10-th day after irradiation. Normalization of antioxidant activity and lipid peroxidation in the seminal plasma took place over 3 months after irradiation.

**Key words:** semen plasma, glutathione, antioxidant activity, free thiols, lipid peroxidation.

---