



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-цистеїнглїцином), гомоцистеїном, цистеїнілглїцином [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 глїцину [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 аликвоти 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*. 3rd 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.
