

УДК 636.2:631.147.611-013.11

**Кава С.Й., Дмитрів О.Я., Івашків Р.М. ©***Львівський національний університет ветеринарної медицини  
і біотехнологій імені С.З. Гжицького***Остапів Д.Д., Яремчук І.М.***Інститут біології тварин НААН***АКТИВНІСТЬ ОКИСНИХ ПРОЦЕСІВ І ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ  
БУГАЇВ ЗА ДІЇ ВІДНОВЛЕНОЇ ФОРМИ ГЛУТАТІОНУ**

Вивчали вплив відновленої форми глутатіону у складі розріджувача еякулятів бугаїв на активність ферментів антиоксидантного захисту, вміст ТБК-активних сполук (МДА) і виживання сперміїв. Встановлено, що еякуляти бугаїв характеризуються об'ємом  $4,3 \pm 0,18$  мл, концентрацією  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  /мл сперміїв, виживанням статевих клітин за температури  $0 - 4^\circ\text{C} - 110,5 \pm 5,70$  год, активністю каталази -  $1,1 \pm 0,25$  мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мл/с та глутатіонпероксидази -  $7,2 \pm 0,44$  мкМ GS-SG/мг білка/хв, вмістом МДА -  $27,5 \pm 2,20$  нМ/мл. Використання в складі розріджувача сперми відновленої форми глутатіону стимулює активність каталази, глутатіонпероксидази свіжоотриманої сперми в концентрації 2,5 та 5,0 мМ та збереженої протягом 24 год – при 5,0 мМ і гальмує утворення ТБК-активних сполук. За додавання у лактозо-жовтково-гліцериновий розріджувач відновленої форми глутатіону в концентраціях, відповідно, 1,25, 2,5 та 5,0 мМ виживання сперміїв при  $0 - +4^\circ\text{C}$  вище на 16,1 - 23,6 % (25,9 - 39,3 год), порівняно до контролю.

**Ключові слова:** відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, каталаза, малоновий діальдегід, сперма, еякулят, бугай

Відомо, що технологічну придатність еякулятів для кріоконсервування й використання у практиці штучного осіменіння найповніше характеризують окисні процеси, їх баланс в спермі. Однак, фізіологічно нормальний перебіг окисних процесів порушується при підготовці до заморожування та після розморожування сперми [1]. Вказані технологічні процеси супроводжуються активуванням мембранозв'язаних ферментів та підвищенням процесів вільнорадикального окиснення жирних кислот і, як наслідок, руйнування ліпопротеїнових комплексів й мембран клітин [2, 3]. Вказані зміни призводять до зниження резистентності і рухливості, втрати основної здатності сперміїв – запліднювати ооцит. Запобігають неконтрольованим процесам окиснення присутні в еякулятах природні антиоксиданти (відновлена форма глутатіону, аскорбінова кислота, вітамін Е та ін.) та ферменти антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза). Проте, в процесі технологічної підготовки сперми до кріоконсервації, антиоксидантний захист послаблюється, а окремі його ланки втрачаються. Дефіцит сполук з

антиоксидантними властивостями поповнюють шляхом їх додаванням у розріджувачі еякулятів та середовища для розморожування сперми [4, 5, 6].

Мета досліджень - вивчити активність ферментів антиоксидантного захисту та виживання сперміїв за додавання відновленої форми глутатіону в розріджувач еякулятів бугаїв.

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проведені у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького та Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». Еякуляти отримували на штучну вагіну з режимом використання бугаїв дуплетна садка два рази на тиждень. У свіжоотриманих еякулятах, оцінених за об'ємом (мл) і концентрацію сперміїв ( $10^9$  клітин/мл), визначали виживання статевих клітин у розрідженій лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем (ЛЖГР) для розбавлення і заморожування сперми бугая у формі гранул при температурі 0 - +4°C до припинення прямолінійно-поступального руху (год); активність глутатіонпероксидази (ГП) - за швидкістю перетворення відновленої форми глутатіону у окиснену за дії  $H_2O_2$  (мкМ GS-SГ/хв/мг білка/хв; активність каталази (КАТ) - з використанням амонію молібдату (мкМ  $H_2O_2$ /мл/с); вміст ТБК-активних сполук (малонового діальдегіда; МДА) - з використанням тіобарбітурової кислоти (нМ/мл)[7]. Вплив відновленої форми глутатіону на окисні процеси вивчали у свіжоотриманих розріджених 1:10 ЛЖГР та через 24 год інкубування еякулятах. В розріджену сперму вносили відновлену форму глутатіону (Г-SH) в концентраціях - 1,25, 2,5 і 5,0 мМ. Статистичний аналіз отриманого матеріалу проведено за М. О. Плохінським [8] з використанням комп'ютера та розроблених програм (програме забезпечення Clipper).

**Результати досліджень.** Еякуляти бугаїв характеризуються об'ємом  $4,3 \pm 0,18$  мл та концентрацією сперміїв  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  клітин /мл, а статеві клітини у свіжоотриманих еякулятах проявляють високе виживання за температури 0 - 4°C -  $110,5 \pm 5,70$  год. Для сперми бугаїв характерна активність каталази -  $1,1 \pm 0,25$  мкМ  $H_2O_2$ /мл/с та глутатіонпероксидази -  $7,2 \pm 0,44$  мкМ GS-SГ/мг білка/хв, вміст МДА -  $27,5 \pm 2,20$  нМ/мл.

Вивченням впливу відновленої форми глутатіону у розріджувачі еякулятів бугаїв на активність ГП, встановлено, що у контролі активність ферменту впродовж 24 год інкубування (зберігання) майже не змінюється ( $9,1 - 10,1$  мкМ GS-SГ/мг білка/хв; табл.). Відновлена форма глутатіону в розріджувачі сперми у дозі 1,25 мМ не впливає на активність ГП ( $8,6 \pm 1,15$  мкМ GS-SГ/мг білка/хв), а у дозах 2,5 та 5,0 мМ стимулює, відповідно, на 34,1 % та 64,8 %. Через 24 год концентрація відновленої форми глутатіону (1,25 мМ) гальмує активність ГП на 50,0 %, 2,5 мМ - не змінює величину значення ( $9,0 \pm 2,32$  мкМ GS-SГ/мг білка/хв), а 5,0 мМ - стимулює на 50,0 % ( $p < 0,01$ ).

Активність каталази у контрольних пробах в процесі інкубування зростає з  $0,13$  мкМ  $H_2O_2$ /мл/с у свіжоотриманій до  $0,17$  мкМ  $H_2O_2$ /мл/с через 24 год інкубування, різниця 30,7 % ( $p < 0,05$ ). За присутності в розріджувачі відновленої форми глутатіону 1,25 та 2,5 мМ активність ферменту

свіжоотриманої розбавленої сперми вище контролю на 61,5 % ( $p < 0,05$ ), а за 5,0 мМ - у три рази ( $p < 0,001$ ). У збереженій протягом 24 год спермі бугаїв, відновлена форма глутатіону проявляє залежну від дози дію: концентрація 1,25 мМ підвищує активність каталази на 23,5 %, 2,5 мМ – на 41,1 % ( $p < 0,001$ ) та 5,0 мМ – на 70,5 % ( $p < 0,001$ ), порівняно до контролю.

Таблиця

**Активність ферментів антиоксидантного захисту та вміст ТБК-активних продуктів у розрідженій спермі бугая**

Біохімічні показники	Сперма	Контроль	За дії Г-SH, мМ		
			1,25	2,5	5,0
ГП, мкМ	свіжоотримана	9,1±0,78	8,6±1,15	12,2±3,48	15,0±2,60
GS-SG/мг білка/хв	збережена	10,1±2,51	5,1±1,29	9,0±2,32	20,2±1,56**
КАТ, мкМ	свіжоотримана	0,13±0,012	0,21±0,016*	0,21±0,007***	0,39±0,024***
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мл/с	збережена	0,17±0,012*	0,21±0,008	0,24±0,005***	0,29±0,007***
МДА, нмоль/мл	свіжоотримана	18,4±4,31	9,1±2,16	12,7±1,98	11,8±1,14
	збережена	14,5±2,80	10,7±2,33	9,6±2,64	3,7±0,30

\* Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до контролю: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Вміст ТБК-активних сполук (МДА) після розбавлення та інкубування 24 год сперми у контролі вірогідно не змінюється (14,5 - 18,4 нМ/мл). Додавання до розріджувача відновленої форми глутатіону у концентраціях 1,25, 2,5 та 5,0 мМ знижує вміст ТБК-активних сполук у свіжоотриманій спермі, відповідно, у 2 рази, на 44,8 та на 55,9 %, а у збереженій протягом 24 год - на 35,5 %, 51,4 % та майже у 4 рази ( $p < 0,01$ ).

Про позитивний вплив антиоксидантів на якість сперміїв свідчить виживання статевих клітин у розріджених еякулятах, у яких при розбавленні лактозо-жовтково-гліцеринним розріджувачем і зберіганні сперми при 0 - +4°C виживання - 127,4±11,33 год, а з додаванням Г-SH в концентраціях, відповідно, 1,25, 2,5 та 5,0 мМ - вище на 16,1 % (153,3±13,60 год), 23,6 % (166,7 ± 8,39 год) і 22,8 % (165,0 ± 7,07 год).

**Висновки:**

1. Еякуляти бугаїв характеризуються об'ємом 4,3 ± 0,18 мл, концентрацією 1,09 ± 0,11 × 10<sup>9</sup> /мл сперміїв, виживанням статевих клітин за температури 0 - 4°C - 110,5 ± 5,70 год, активністю каталази - 1,1 ± 0,25 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мл/с та глутатіонпероксидази - 7,2 ± 0,44 мкМ GS-SG/мг білка/хв, вмістом МДА - 27,5 ± 2,20 нМ/мл.

2. Використання в складі розріджувача сперми відновленої форми глутатіону стимулює активність каталази, глутатіонпероксидази свіжоотриманої сперми в концентрації 2,5 та 5,0 мМ та збереженої протягом 24 год – при 5,0 мМ і гальмує утворення ТБК-активних сполук.

3. За додавання у лактозо-жовтково-гліцеринний розріджувач відновленої форми глутатіону в концентраціях, відповідно, 1,25, 2,5 та 5,0 мМ виживання сперміїв при 0 - +4°C вище на 16,1 - 23,6 % (25,9 - 39,3 год), порівняно до контролю.

### Література

1. Наук В. А. Структура и функции спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук — Кишинев: Штиинца, 1991. — 198 с.
2. Jones R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma / R. Jones, T. Mann., R. Sherins // Fertil. Steril. — 1979. — Vol. 31. — P. 531–537
3. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa / A. Koppers, G. De Iuliis, J. Finnie, R. Aitken // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2007. — Vol. 93. — P. 3199–3207.
4. Slaweta R. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen sperm / R. Slaweta, T. Liaskowska // Anim. Reprod. Sci. — 1987. — Vol. 13. — P. 249–253.
5. Donnelly E. The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa / E. Donnelly, N. McClure // Mutagenesis — 1999. — Vol. 14. — P. 505–512.
6. Шаран М. М. Підвищення ефективності штучного осіменіння корів і телиць / М. М. Шаран — Львів, 2009. — 38 с.
7. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / Довідник. під ред. В.В.Влізло - Львів, 2004. — 399с.
8. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский // М.: Колос, 1969. — 255с

### Summary

#### **ACTIVITY OF OXIDATIVE PROCESSES AND SURVIVAL OF BULL SPERMATOZOA FOR ACTION OF REDUCED FORM OF GLUTATHIONE**

*The effect of reduced glutathione within diluent of bull ejaculates on the activity of enzymes of antioxidant defense, content of TBA-active products (MDA) and spermatozoa survival were studied. It is found that bull ejaculates characterizes by volume  $4,3 \pm 0,18$  ml, concentration  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$  /ml of spermatozoa, survival of sex cells by temperature 0 - 4°C -  $110,5 \pm 5,70$  hours catalase activity -  $1,1 \pm 0,25$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{ml/s}$  and glutathione peroxidase  $7,2 \pm 0,44$   $\mu\text{mol GS-SG/mg protein/min}$ , content of MDA -  $27,5 \pm 2,20$  nmol/ml. The use of reduced glutathione in sperm diluent stimulates the activity of catalase, glutathione peroxidase of freshlyobtained semen in concentrations of 2,5 and 5,0 mM and in sperm that was kept by 24 h – at 5,0 mM it slows formation of TBA-active compounds. By adding lactose-yolk-glycerol diluent reduced glutathione in concentrations, respectively, 1,25, 2,5 and 5,0 mM spermatozoa survival at temperature 0 - 4°C was higher on 16,1 - 23,6 % (25,9 - 39,3 h), comparing to control.*

**Key words:** reduced glutathione, glutathione peroxidase, catalase, malonic dialdehyde, semen, ejaculate, bull.

Рецензент – д.вет.н., професор Стефаник В.Ю.