

УДК 636.4:612.014

РОЛЬ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО ГОМЕОСТАЗУ У ФОРМУВАННІ ВІДТВОРЮВАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ ТВАРИН

А. М. Шостя, доктор с.-г. наук, с. н. с., професор,

С. О. Усенко, кандидат біол. наук, с. н. с., професор,

М. М. Маслак, аспірант,

О. М. Бондаренко, кандидат с.-г. наук, доц., професор,

В. І. Березницький, старший викладач,

І. В. Павлова, аспірант,

Р. М. Кір'ян, аспірант.

Полтавська державна аграрна академія

У статті розглянуто результати досліджень щодо регулюючої дії активних форм Оксигену (АФО) на основні процеси життєдіяльності тварин, які перебувають під постійним контролем прооксидантно-оксидантного гомеостазу. Розкрито джерела утворення АФО, їх вплив на біологічні процеси в організмі, який полягає у регуляції синтезу ензимів у печінці, м'язах, серцево-судинній системі та запліднення. Встановлено, що в організмі тварин найчутливішими до перебігу процесів вільно-радикального пероксидного окислення ліпідів є статеві клітини. Визначено сигнальну роль АФО у ре-гуляції життєдіяльності спермій, вплив їх кількості на запліднюючу здатність. Високі рівні АФО можуть перешкоджати зливанню ооцита зі сперміями, знижуючи їхню рухливість. Визначений вплив високих концентрацій Оксигену на розвиток ембріонів ссавців.

Ключові слова: вільнорадикальне пероксидне окислення ліпідів, активні форми оксигену, апоптоз, антиоксиданти, спермії, капациація, запліднення, ембріони.

Упродовж останніх десятиріч накопичену значну кількість експериментальних даних щодо регулюючої дії активних форм Оксигену на основні процеси життєдіяльності тварин, які перебувають під динамічним контролем прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. Тривалий час вважалося, що активні форми Оксигену здійснюють негативний пошкоджувальний вплив на основні процеси росту і розвитку тварин [1, 2]. Однак розкриття ролі активних форм Оксигену тільки з негативної сторони не дозволяє всебічно розкрити весь спектр їх дії на відтворювальну функцію тварин.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для статті став аналіз наукових досліджень вітчизняних та зарубіжних авторів, які вивчали регулюючу дію активних форм Оксигену (АФО) на основні процеси життєдіяльності тварин, які перебувають під постійним контролем прооксидантно-оксидантного

гомеостазу. Методологічною основою досліджень є сучасна теорія і практика досліджень впливу АФО на біологічні процеси росту і розвитку тварин. Використано абстрактно-логічний (теоретичні узагальнення та формування висновків) метод дослідження.

162

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Тваринництво», випуск 7 (35), 2018

Результати досліджень. Результати досліджень вітчизняних і зарубіжних науковців минулого десятиліття сприяли розкриттю позитивної ролі АФО на біологічні процеси у організмі, яка полягає у регуляції синтезу ензимів у печінці, м'язах, серцево-судинній системі та процесів запліднення [1, 3]. АФО приймають участь у процесах формування спермій і яйцеклітин, капацитації та розвитку ембріонів. У організмі тварин найчутливішими до перебігу процесів вільно-радикального пероксидного окислення ліпідів є статеві клітини, плазматичні мембрани яких насичені жирними кислотами, стеринами та фосфоліпідами, що підвищує деструктивну дію АФО [3]. Джерелами АФО є мітохондрії, плазматичні мембрани спермій та лейкоцити. За здатністю до руху та властивістю продукувати супероксид, спермії подібні до лейкоцитів, а відмінністю між ними є гаплоїдний набір хромосом і те, що джерелом АФО у них є мітохондрії [4, 5].

АФО виконують сигнальну роль у регуляції життєдіяльності спермій [6]. У невеликих кількостях ці радикали забезпечують гіперактивацію спермій та стимулюють розвиток акросомної реакції, проте їх надлишковий вміст може спричинити порушення функціонування клітин, пошкодження мембран, що призводить до зниження запліднювальної здатності в цілому [7]. Встановлено негативну кореляцію між порушеннями в мітохондріях і відсотком мертвих спермій [1, 8].

Плазма сперми відіграє головну антиоксидантну роль, захищаючи сперматозоїди від АФО, що продукуються лейкоцитами. Проте сперматозоїди мають власні мінімальні кількості високомолекулярних та низькомолекулярних анти-оксидантів. Доведено, що активність супероксиддисмутази (СОД) у спермі дуже варіабельна, а глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази більш стабільна. Активність СОД прямо пропорційна життєдіяльності і рухливості спермій [9]. У плазмі сперми кнурців найбільш істотні зміни про-оксидантно-антиоксидантного гомеостазу в напрямі прискорення пероксидного окиснення відбуваються з

п'ятого по сьомий місяці розвитку: зростає вміст дієнових кон'югатів, підвищується концентрація ТБК-активних сполук. Це супроводжується зростанням активності супероксиддисмутази та каталази. При цьому, інкубування цієї тканини супроводжується прискоренням пероксидного окиснення ліпідів, проте вплив температурного фактору зменшується зі збільшенням віку кнурів [24].

Рівень продукування АФО сперматозоїдами змінюється на різних стадіях їх дозрівання. При цьому кількість їх генерованих незрілими сперміями з аномальною морфологією є досить високою та знижує якісні показники сперми. Про те збільшення рівня антиоксидантів у мембранах дозрілих статевих клітин під час сперматогенезу дозволяє зменшити негативний вплив АФО незрілими сперміями [10].

Перебування спермій в умовах сталого середовища – епідидимісі сім'яного придатка, де відбуваються окремі стадії дозрівання, супроводжується змінами інтенсивності пероксидного окиснення – у хвостовій частині цей процес більш прискорений [11].

Ушкоджена ДНК спермій після мейозу може потрапляти до зиготи, порушуючи розвиток ембріонів. Пошкодження ДНК відбувається шляхом її гідроксилювання та утворенням 8-оксигуаніну, що являється біологічним маркером. Відома негативна кореляція між рухливістю спермій та вмістом 8-оксигуаніну і також між інтенсивністю вільно-радикального пероксидного окиснення (ВРПО) та рухливістю спермій [11, 12, 13].

Наявність фізіологічних рівнів АФО є необхідним фактором для капацитації спермій, їхньої реакції прилипання до зони пелюциди ооцита, стимуляції процесів гіперактивації, розвитку акросомної реакції та злиття з ооцитом. Причиною втрати рухливості спермій та здатності до запліднення може бути інтенсифікація перебігу ВРПО на фоні виснаження системи антиоксидантного захисту через пошкодження мембран, фрагментацію їхньої ДНК та фосфорилуванням протеїнів у мітохондріях [14].

При надходженні у жіночі статеві шляхи спермії потрапляють у середовище з високим вмістом вільних радикалів, продукованих нейтрофілами. Високі рівні АФО часто перешкоджають зливанню ооцита зі сперміями, знижують їхню рухливість. Однак спермії, які вже пройшли стадію капацитації, майже не руйнуються фагоцитами. Виявлено, що навіть у разі пошкодження вільними радикалами ДНК, спермій можуть проникати в оцити [15].

Продуктування власного низького рівня реактивного Оксигену і пероксиду Гідрогену є однією з умов злиття спермій з ооцитом. Генеровані високі рівні АФО сперміями інактивуються тіоловими сполуками, СОД і каталазою. Тіоловим сполукам, особливо Glu, належить провідна роль у підтриманні екзогенних антиоксидантів – вітамінів С і Е у їхніх редукованих формах [16]. Встановлено, що рівень Glu та вітаміну С завжди вищий у спермі з високою за-пліднювальною здатністю спермій.

Висока активність СОД супроводжується сповільнен-ням рухливості спермій і зниженням рівня капацитації. При цьому активність цього ензиму у сперміях негативно корелює із процесами їх злиття з ооцитами, а позитивно – з прискоренням ВРПО. Тільки в умовах низького рівня каталази у спермі відбувається продуктування достатньої кількості пероксиду сперміями. Введення каталази до складу середовища для розбавлення сперми сприяє покращенню їхньої життєздатності, підвищує рівень розвитку акросомної реакції та знижує рівень фрагментації ДНК [20].

Генеровані сперміями пероксиди відіграють важливу роль у розвитку капацитації, а можливо і мембранній реорганізації, що сприяє полегшеному злиттю ооцита після екзоцитозу акросоми. Одним із перспективних напрямків біотехнології є дослідження властивостей еякульованої сперми та її збереження. Для стимуляції процесів ВРПО в умовах *in vitro* використовують Fe_2SO_4 , аскорбат натрію та ксантиноксидазу. Культивування спермій з ксантиноксидазою протягом години призводить до зростання АФО (особливо пероксидів) та пошкодження ДНК шляхом фрагментації, а додавання антиоксидантів сприяє репарації та відновленню їхньої рухливості. Досліди за введення глюкози, Glu і глутатіонтрансферази в середовище для культивування спермій показали зниження рівня продуктування пероксиду і альдегідів, а також сповільнення настання апоптозу, що сприяє її збереженню [21].

Важливим питанням, що потребує вирішення, є зниження негативної пошкоджувальної дії АФО, які виникають у великій кількості при розморожуванні та заморожуванні сперми і можуть пошкоджувати мембрани. Додавання до розбавника токоферолу, Glu і СОД є ефективним при про-

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Тваринництво», випуск 7 (35), 2018

веденні цих маніпуляцій зі спермою [19, 21].

Уведення аскорбінової кислоти та токоферолу у культуральне середовище після запліднення призводить до збільшення кількості утворених бластоцист. Включення до складу розбавника сперми α -токоферолу у процесі збереження сприяє зменшенню накопичення продуктів перокси-дації та зниженню окислення ненасичених жирних кислот, що містяться в фосфоліпідах [22].

З настанням поросності на різних її етапах відбуваються морфологічні, фізіологічні та біохімічні зміни, особливої уваги заслуговує дослідження стадійних змін перебігу ВРПО. У крові свинок у період статевої охоти відмічено прискорення даних процесів, а протягом першого місяця поросності в цій тканині спостерігалось зниження рівня каталази та ТБК-активних компонентів. Впродовж четверто-го місяця поросності виявлено зростання активності даного ензиму та зниження кількості вторинних продуктів перокси-дації, аскорбінової кислоти і Glu [23]. Згідно з аналогічними дослідженнями, концентрація дієнових кон'югатів у плазмі крові свиноматок у період від 80-ї до 110-ї доби поросності зростає, а впродовж першого місяця лактації спадає. Кількість вторинних продуктів пероксидації зростає перед опоросом, тримаючись до закінчення першої декади після народження поросят.

Перебіг ВРПО у тканинах репродуктивних органів свиноматок залежить від стадій відтворювального циклу: суттєві коливання концентрацій антиоксидантів у ендометрії і міометрії зареєстровані протягом стадії естрального циклу, зокрема - підвищення рівня вітамінів А, Е та С, цистеїну та марганцю у фазі еструсу (охота) при зменшенні кількості заліза [23]. Доведено, що активність прооксидантних і анти-оксидантних ензимів та продуктів пероксидації у цих тканинах суттєво зростає під час статевої охоти та в критичні періоди ембріогенезу, за умов міжтканинної диференціації перебігу процесів ВРПО [24].

В яєчниках свині та щурів виявлено генерування АФО і накопичення продуктів ПОЛ жовтим тілом, а ці речовини, можливо, є лімітуючими у період проходження лютео-лізу, а також модифікації протеїнів протягом його функціонування. Радикали кисню також продукуються фолікулом при овуляції. Доведено, що антиоксидантам притаманна властивість блокувати мейоз, тоді як генерація АФО сприяє дозріванню ооцитів у фолікулах. Проте надмірне довготривале продукування даних радикалів може стимулювати розвиток анеуплоїдії впродовж формування ооциту [26, 27].

Після запліднення залишається загроза пошкодження АФО двохклітинних ембріонів корів, мишей та кролів. При цьому у людини особливого значення набуває додатковий синтез та надходження СОД у порожнину яйцепроводів для інактивації надмірного рівня вільних форм Оксигену [27].

Високі концентрації Оксигену є токсичними для ембріонів ссавців. Додавання СОД до культурального середовища 2-клітинних ембріонів миші прискорювало процес бластуляції на 40%. Активність цього ензиму також визначено в рідині яйцепроводів кролиць, де він сприяє бластуляції та захищає ембріони від пероксидних радикалів [28].

У період імплантації ембріони ссавців часто гинуть від пошкодження вільними радикалами. У недорозвинених рівень ВРПО значно вищий, ніж у нормальних. У плаценті тварин містяться великі кількості ГПР і СОД, які знешкоджують перекиси та регулюють інтенсивність процесів ВРПО, забезпечуючи нормальне протікання вагітності. Надмірне накопичення продуктів пероксидації в плодових оболонках може спричиняти зростання рівня гідроперекисів у крові, патологічні зміни в міометрії, що викликає загрозу порушення вагітності. У збереженні вагітності провідну роль відіграє СОД, яка регулює тонус міоцитів плідної артерії [29].

Вагітність викликає суттєву перебудову перебігу ферментативного та неферментативного ВРПО. Так, у крові корів вміст продуктів пероксидації на ранніх етапах тільності вищий, ніж у фазі статевого спокою. Під час плацентації зародків вміст первинних і вторинних продуктів ВРПО знижується, а аскорбінової кислоти зростає. Передпологовий і пологовий періоди характеризуються прискоренням даного процесу та накопиченням дієнових кон'югатів і ТБК-активних компонентів. Після отелення інтенсивність перебігу процесів пероксидації ліпідів сповільнюється, наближаючись до рівня фази статевого спокою [27].

Доведено провідну роль вітаміну С у забезпеченні синтезу оксипроліну - складової частини плодових оболонок. Зниження рівня цього вітаміну в сироватці крові матері і плодів часто супроводжується передчасними розривами плодових оболонок та загибеллю плодів. Транспорт антиоксидантів через плаценту регулюється потребою плодів. Зокрема, вітамін Е у людини є малопрониклим через плаценту. Найбільша кількість його транспортується в останні періоди вагітності. Близьку закономірність відмічено і для морських свинок [31].

Зі збільшенням віку ембріонів спостерігається зростання рівня системи антиоксидантного захисту. У легенях плодів щурів від 20-го дня ембріогенезу і до народження зростає активність глутатіонпероксидази на 135%, каталази – 130%, СОД - 52%. Дещо інша динаміка рівня глутатіонпероксидази спостерігається впродовж поросності свині, особливо перед опоросами, коли активність цього ензиму зростає у печінці і легенях матері, плаценті та печінці плода, а після опоросу знижується.

Ферментативна система антиоксидантного захисту плодів свиней починає активізуватись лише перед пологам та у післяпологовий період через інтенсифікацію процесів ВРПО, у наслідок чого новонароджені поросята часто гинуть за причини зростання кількості АФО, продукуваних ксантинооксидазою, які провокують вазоконстрикцію [33].

Рівень перебігу ВРПО у ембріонів свиней можна регулювати, включаючи до раціону різні антиоксиданти. Введення свиноматкам у період поросності вітаміну Е і селену сприяє зниженню рівня вторинних продуктів пероксидації та підвищенню активності глутатіонпероксидази у крові поросят [31].

Стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу значною мірою визначається вмістом кисню в повітрі, яке вдихає тварина, та внутріклітинною гіпоксією тканин організму, що виникає з різних причин й супроводжується прискоренням окислювально-відновних реакцій. Це підтверджується на новонароджених дітях і щурятах, які перебували в умовах внутрішньоутробної гіпоксії. Зміщення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в напрямку прискорення пероксидації процесів, відбувається одночасно зі зниженням активності СОД і каталази крові. Ця закономірність підтверджується і в дослідженнях на плодах та новонароджених кролятах: активність і синтез СОД у

легенях плодів знаходяться на низькому рівні, а після народження швидкість перебігу цих процесів інтенсивно зростає. Однак, у свиноматки під дією внутрішньоутробної гіпоксії в легенях плодів, а також у новонароджених поросят, активність і синтез цього ферменту дуже низький. Отже, пренатальна гіпоксія затримує секрецію і синтез СОД у легенях плодів і новонароджених тварин. Після народження поросят при переході на легене

дихання у них відбувається активація процесів ВРПО у різних тканинах. У крові одно-денних поросят перебіг процесів пероксидації вищий, ніж у 10-денних, а у печінці - переважає дорослих [30].

Висновки: Викладені багаточисельні експериментальні дані свідчать про те, що спермії у процесі проходження через придаток сім'яника, підлягають впливу ряду структурних перебудов: зміни складу та потенціалу мембран, конденсації хроматину, набуття властивості до руху. Всі перетворення відбуваються за участю АФО та під динамічним контролем прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу. АФО, що генеровані сперміями, належить провідна роль у трансдукції сигналів, регуляції процесів гіперактивації, розвитку акросомної реакції та їх капацитації. Оптимальні концентрації кисню регулюють нормальне протікання вагітності у самок забезпечуючи нормальний ріст і розвиток ембріонів ссавців.