

УДК 577.1:611.013.11/57.042

А. В. Клепко✉, О. А. Мотрина, В. М. Булавицька, Ю. А. Кондратова, О. С. Ватліцова,
А. В. Чернишов, С. В. Андрейченко

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, Київ, 04050, Україна

АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ СПЕРМИ ЗА УМОВ ТОТАЛЬНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ ТВАРИН

Мета: дослідити динаміку змін вмісту природних антиоксидантів та активності антиоксидантних ферментів у сім'яній рідині сперми кролів за умов одноразового тотального рентгенівського опромінення тварин в різних дозах.

Матеріали та методи. Досліди проведено на білих кролях-самцях віком 30–36 місяців породи Радянська шиншила (Soviet Shinshilla). Збір сперми здійснювали за допомогою штучної вагіни. Відокремлення сім'яної рідини від сперматозоїдів проводили центрифугуванням при 2500 г 12 хв. Тотальне рентгенівське опромінення тварин проводили на установці РУМ-17 (Росія) в дозах 1,0; 2,0; 5,0 та 7,0 Гр з потужністю дози $2,8 \times 10^{-3}$ Гр/с. Після опромінення сперму збирали на 10-ту та 90-ту добу. Вміст вільного глутатіону та тіолових груп визначали за допомогою 2,2-дитіобіснітробензойної кислоти спектрофотометричним методом. Рівень пероксидації ліпідів оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів. Ферментативну активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази вимірювали спектрофотометрично.

Результати. Показано, що в діапазоні доз 1,0–7,0 Гр при тотальному опроміненні кролів рентгенівськими променями відбувається дозозалежне збільшення антиоксидантної ферментативної активності сім'яної рідини на 10-ту добу після опромінення. Це поєднувалось зі зменшенням в ній концентрації вільних тіолів, з одного боку, та зростанням вмісту ТБК-активних продуктів і окисненого глутатіону, з іншого. Такий стан сім'яної рідини був тимчасовим, оскільки протягом наступних 90 днів після опромінення спостерігалась поступова нормалізація вищевказаних параметрів сперми.

Висновки. Встановлено, що тотальне рентгенівське опромінення тварин спричиняє значне посилення антиоксидантних процесів, як ферментативного, так і неферментативного типу, вже на 10-ту добу після радіаційного періоду. При цьому сила прояву радіаційних ефектів залежала від отриманої дози іонізуючої радіації. Згодом антиоксидантна активність починала згасати, причому для доз опромінення 1,0 та 2,0 Гр нормалізація метаболізму за дослідженими параметрами відбувалася протягом 90 діб.

Ключові слова: сперма, сім'яна рідина, антиоксидантна активність, ферменти, вільні тіоли, глутатіон, кролі, тотальне опромінення.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 407–418.

✉ Клепко Алла Володимирівна, e-mail: kallav@mail.ru

A. V. Klepko✉, O. A. Motrina, V. M. Bulavytska, Yu. A. Kondratova, O. S. Vatlitsova, A. V. Chernyshov, S. V. Andreychenko

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Analysis of the antioxidative qualities of sperm after total body X-irradiation of animals

Objective: To study dynamics of natural antioxidant levels and antioxidant enzymes activities in rabbit seminal fluid in conditions of single total body X-ray irradiation in different doses.

Materials and methods. Soviet Shinshilla white rabbit males 30–36 months old were taken into investigation. Sperm was collected by artificial vagina. Seminal fluid was purified from spermatozoa by centrifugation at 2500g during 12 min. Animals were irradiated by X-rays on RUM-17 device (Russia) in doses 1.0; 2.0; 5.0 and 7.0 Gy with dose rate 2.8×10^{-3} Gy/sec. Sperm was gathered on 10th and 90th day after irradiation. Free glutathione and thiol concentration were assessed by spectrophotometry using 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid, lipid peroxidation was evaluated by measuring of TBA-active products concentration. Enzymatic activities of superoxidismutase, catalase, glutathionperoxidase and glutathionreductase were estimated in substrate specific reactions spectrophotometrically.

Results. Dose-dependant up-regulation of antioxidant enzymatic activity of seminal fluid on the 10th day after exposure to 1.0–7.0 Gy dose range of total X-ray irradiation was shown. This effect was accompanied by the decrease of free thiols concentration, from the one hand, and both TBA-active products and oxidized glutathione contents elevation, from the other hand. This seminal plasma state was shown to be temporal and partially normalized on 90th day after exposure.

Conclusions. Total X-ray irradiation of rabbits leads to significant up-regulation of antioxidant processes of both enzymatic and non-enzymatic type on the 10th day after radiation exposure in seminal plasma. This effect was shown to be dose-dependant. Then antioxidant activity dropped and metabolic activities gradually normalized according to studied parameters within 90 days after exposure in 1.0 and 2.0 Gy.

Key words: sperm, seminal fluid, antioxidant activity, enzymes, free thiols, glutathione, rabbits, total irradiation.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:407-418.

ВСТУП

Добре відомо, що статеві клітини, з яких утворюються сперматозоїди, протягом сперматогенезу знаходяться у фазі активного поділу та диференціації. Тому навіть при короткому контакті з іонізуючою радіацією в них можуть виникати радіаційні пошкодження різного ступеня [1]. Згодом такі пошкодження дуже часто призводять до втрати фертилізаційного потенціалу сперматозоїдами і, як наслідок, до розвитку вад чоловічої репродуктивної системи та безпліддя [2].

Встановлено, що ключову роль у статевому процесі і заплідненні відіграє сім'яна рідина, яка утворюється за рахунок секреторної активності епідидимісів, сім'яних пухирців, простати та бульбоуретрозних залоз. Сім'яна рідина багата на фруктозу, простагландини, карнітин, глутатіон, аскорбат, токоферолі, вільні тіоли, різні ферменти і мінерали [3]. Такий компонентний склад рідини робить її цінним поживним середовищем, що забезпечує життєдіяльність сперматозоїдів та сприяє збереженню їх запліднюючих властивостей (інколи до трьох тижнів) при

INTRODUCTION

It is known, that germ cells being the progenitors of spermatozoa – are involved in active proliferation and differentiation in the process of spermatogenesis. That is why they may get defects of different complexity even under short-term impact from the ionizing radiation [1]. Subsequently, these defects may very often lead to the lack of spermatozoid fertilizing capacity that attenuates male reproductive system potential and elicits infertility [2].

Seminal plasma plays key role in the sexual process and insemination. It is produced by secretion of epididymices, seminal vesicles, prostate and bulbourethral glands. This liquid is full of fructose, prostaglandins, carnitine, glutathione, ascorbate, tocopherols, free thiols, different enzymes and minerals [3]. Such liquid component composition makes it a useful nutritive media for spermatozoa, which can survive and retain their fertilizing potential (sometimes for 3 weeks) during long-term presence in female

тривалому перебуванні в жіночих статевих шляхах, а також своєчасному набуттю ними гіперактивності при контакті з кумулюсним комплексом ооциту II. Додаткового значення сім'яна рідина набуває за умов радіаційного впливу, оскільки радіопротекторні властивості відновленого глутатіону, вільних тіолів, токоферолів, аскорбату, антиоксидантних ферментів стають вкрай корисними для захисту не тільки сперматозоїдів, але й жіночих гамет при статевому процесі [4].

Присутність антиоксидантів у спермі є дуже важливим фактором для збереження інтегральної цілісності сперматозоїдів, їх рухливості та здатності до взаємодії з яйцеклітиною. Так, токоферолі і аскорбат запобігають руйнуванню подвійних зв'язків у ненасичених жирних кислотах, що у великій кількості сконцентровані в мембранах сперматозоїдів [5]. В той же час, вільні тіоли, особливо цистеїн, сприяють відновленню дисульфідних зв'язків і утворенню сульфгідрильних груп у структурі нуклеопротамінового комплексу, що полегшує деконденсацію хроматину при утворенні чоловічого пронуклеусу в ооциті II [6]. 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 до GSH здійснюється глутатіонредуктазою за допомогою відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ•Н). Збільшення пулу відновленого глутатіону може здійснюватись також і завдяки його синтезу *de novo* шляхом послідовного ферментативного приєднання двох залишків амінокислот цистеїну та гліцину L – до глутамату [7]. Потреба в існуванні системи надійного захисту від активних форм кисню (АФК) в спермі зумовлена тим, що сперматозоїди стають мішенню для атаки як АФК, що продукуються спермальними лейкоцитами, так і АФК самих сперматозоїдів, що утворюються під дією НАДФ•Н-залежної оксидази голівки за умов гіперактивності та акросомної реакції, а також при функціонуванні електронтранспортного ланцюга мітохондрій [8].

МЕТА

Метою роботи було дослідити в динаміці зміни вмісту природних антиоксидантів та активності ферментів в сім'яній рідині сперми кролів за умов одного тотоального рентгенівського опромінення тварин в різних дозах.

sexual routes and then become hyperactivated when interacting with the cumulus complex of oocyte II. Seminal fluid possesses very important protective patterns in radiation conditions due to radioprotective properties of reduced glutathione, free thiols, tocopherols, ascorbate, antioxidant enzymes, which appear very beneficial not only for spermatozoa protection but also for oocytes and female gametes upon insemination [4].

Antioxidant presence in sperm is very important factor for preserving general integrity of spermatozoa, their motility and ability for “cooperation” with oocyte. Thus, tocopherols and ascorbate prevent damage of double links in unsaturated fatty acids which are concentrated in spermatozoid membranes in high amounts [5]. At the same time, protein bound free thiols, especially cysteine, cause the reduction of disulfide links in the structure of nucleoprotamine complex, thereby promoting chromatin decondensation in the course of male pronucleus formation in the oocyte II [6]. Glutathione (GSH), as a coenzyme of glutathionperoxidase, neutralizes hydrogen peroxide, which forms as a result of processing superoxide radicals by superoxidisedismutase, transforming it into glutathione disulfide (GSSG). Then glutathione-reductase reduces oxidized glutathione to GSH by the help of reduced nicotineamidinucleotidphosphate (NADPH•H). Reduced glutathione is also formed from L-glutamate by the sequential enzymatic joining of two amino acid residues – cysteine and glycine [7]. The real need in sperm defense system from reactive oxygen species (ROS) does exist because spermatozoa become the target for attack of either ROS produced by sperm leukocytes or by spermatozoa per se through the action of NADPH•H-dependant oxydase of spermatozoid caput in conditions of hyperactivation and acrosomal reaction and also due to function of electron-traffic in mitochondrial oxidative chain [8].

OBJECTIVE

Objective of the work were to study in dynamics the changes of contents of natural antioxidants and enzymatic activities in rabbit seminal plasma in conditions of total animal body single X-ray irradiation in different doses.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проведено на 30 білих кролях-самцях віком 30–36 місяців породи Радянська шиншила (Soviet Shinshilla). Тварини утримувались в окремих клітках у контрольованих умовах, а саме при температурі повітря 16–22 °С, світловому дні в 16 годин і освітленості в 38 лк, а також на стандартному харчовому раціоні. Експерименти здійснено у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях. Збір сперми проводили за допомогою штучної вагіни. Підрахунок кількості сперматозоїдів проводили за допомогою камери Горяєва мікроскопічно при збільшенні $\times 200$. Відокремлення сім'яної рідини від сперматозоїдів проводили центрифугуванням при 2500 g протягом 12 хв.

Тотальне опромінення тварин здійснювали на установці РУМ-17 (фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно – фокусна відстань 50 см, струм 10 mA, напруга 200 кВ, потужність поглинутої дози 0,0028 Гр/с) в дозах 1,0; 2,0; 5,0 та 7,0 Гр. Після опромінення сперму збирали на 10-ту та 90-ту добу.

У сім'яній рідині сперми визначали ферментативну активність компонентів антиоксидантної системи: супероксиддисмутази (СОД), (КФ 1.15.1.1) [9], каталази (пероксид водню: пероксид водню оксидоредуктаза (КФ 1.11.1.6) [10], глутатіонпероксидази (ГП), (КФ 1.11.1.9) та глутатіонредуктази (ГР), (КФ 1.6.4.2) [11]. Пероксидацію ліпідів вивчали за вмістом ТБК-активних продуктів, які оцінювали за кількістю малонового діальдегіду (МДА) [12]. Реєстрацію продуктів реакції здійснювали на спектрофотометрі "Specol-211" (Німеччина).

Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону в сім'яній рідині проводили за допомогою 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (ДТНБК) та НАДФН [13]. При визначенні GSH його спочатку окиснювали за допомогою ДТНБК у GSSG, а потім GSSG відновлювали глутатіон-редуктазою до GSH за участі НАДФ•Н. При аналізі вмісту GSSG в сім'яній рідині реакцію окиснення GSH у GSSG зупиняли за допомогою 2-винілпіридину при 25 °С через 1 годину, а 2-нітро-5-тіобензойну кислоту, що утворювалась в процесі окиснення, визначали спектрофотометрично на довжині хвилі 412 нм. Для побудови стандартних кривих використовували розчини GSH відомої концентрації.

Кількісний аналіз загального вмісту вільних тіолових груп у сім'яній рідині здійснювали відповідно до методики [14]. За протоколом, до аліквоти сім'яної рідини додавали реакційну суміш, що складалась з

MATERIALS AND METHODS

White male rabbits 30–36 month old Soviet Shinshilla strain were studied. Animals were in separate cages in controlling conditions – with air temperature 16–22 °C, light day 16 h, with brightness 38 lk, with standard feeding formula. Experiments were performed according to convention of European Council about protection of vertebrate animals used in research goals. Sperm was collected with artificial vagina. Counting the number of sperm was performed in the Goryaev chamber (hemocytometer) microscopically with $\times 200$ magnification. Semen liquid was separated from sperm by centrifugation with 2500 g 12 min.

Animals were irradiated at RUM-17 X-ray facility (filters – 0,5 mm Cu and 1 mm Al, skin-focus distance – 50 cm, current 10 mA, voltage 200 kV, absorbed dose power 0.0028 Gy/sec) in doses 1.0; 2.0; 5.0 and 7.0 Gy. Sperm was collected on 10th and 90th day after irradiation.

Enzymatic activity of antioxidant system components: superoxidismutase (SOD) (CE 1.15.1.1) [9], catalase (Hydrogenium peroxide: Hydrogenium peroxide oxidoreductase), (CE 1.11.1.6) [10], glutathione-peroxidase (GP) (CE 1.11.1.9) and glutathionreductase (GR), (CE 1.6.4.2) [11] was studied in seminal fluid. Lipid peroxidation was studied by evaluation of TBA (thiobarbyturic acid)-active products contents which was assessed by measuring of malonic dialdehyde concentration [12]. Reaction products were registered on "Specol-211" spectrophotometer (Germany).

Reduced and oxidized glutathione contents in seminal fluid were assessed by measuring of 5,5 – dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNBA) and NADPH levels [13]. When GSH was studied, it was first oxidized into GSSG by DTNBA, and then GSSG was reduced to GSH by glutathionreductase with NADPH. When GSSG level in seminal plasma was assessed, we neutralized the reaction of oxidizing of GSH into GSSG by 2-vinylpiridin at 25 °C during 1 hour. 2-nitro-5-thiobenzoic acid appeared in the oxidizing process and it was measured by spectrophotometry at the wave length 412nm. We used GSH solution to make standard curves.

Quantitative analysis of total free thiol group content in seminal fluid was done according to procedure [14]. According to the protocol, reactive mixture which consisted of 2,2-dithiobisnitrobenzoic

2,2-дитіобіснітробензойної кислоти у трис-буфері (рН 8,2) з Na₂ЕДТА 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.

Порівняння даних для різних груп кролів проводили із застосуванням дисперсійного аналізу "ANOVA" та непарного теста Стюдента 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 складала двобічні криві розподілу випадкових даних. Відмінності вважали статистично значущими при p ≤ 0,05 [15].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У сім'яній рідині міститься значна кількість антиоксидантів, що захищають клітини і біологічно важливі макромолекули від різноманітних ушкоджень. Величини досліджуваних нами показників антиоксидантної системи сперми кролів контрольної групи узгоджувались з даними інших авторів та підтверджували відповідну якість сперму в групі контрольних тварин (табл. 1).

acid in tris-buffer (pH 8.2) with Na₂EDTA and absolute methanol was added to aliquot of seminal fluid. Solution which appeared, we firstly mixed on automatic vortex-mixer "Vortex" (Russia), and then incubated for 20 min at room temperature. After it, solution was centrifuged at 3500 g 10 min. Optic density of transparent supernatant was measured at 412 nm. Standard calibrating curves were made for GSH solutions in distilled water.

Comparison of data from different groups of rats was performed using "ANOVA" analysis and unpaired Student's t test with Bonferroni correction. Confidential intervals for mean values were detected by t-criterion with p=0.95 in combination with standard error. Two-tailed curves of occasional data were used as a basis for statistic analysis. Differences with p ≤ 0.05 were considered significant [15].

RESULTS AND DISCUSSION

There are many antioxidants in seminal fluid which protect cells and biologically important macromolecules from different damages. Rabbit sperm parameter's of antioxidant system from control group were in accordance with results of other authors and confirmed sperm quality in control animals' group (table 1).

Таблиця 1

Характеристика сперми кролів контрольної групи за досліджуваними показниками

Table 1

Sperm characteristics of control group of rabbits

Показник сперми Sperm parameter	Середня величина Mean value ±SE
Концентрація глутатіону відновленого Reduced glutathione concentration	2,23 ± 0,15 мкмоль/10 ⁸ сперматозоїдів 2.23 ± 0.15 μmol/10 ⁸ spermatozooids
Концентрація глутатіону окисненого Oxidized glutathione concentration	0,037 ± 0,01 мкмоль/10 ⁸ сперматозоїдів 0.037 ± 0.01 μmol/10 ⁸ spermatozooids
Концентрація вільних тіолів Free thiols concentration	5,87 ± 1,10 нмоль/10 ⁸ сперматозоїдів 5.87 ± 1.10 μmol/10 ⁸ spermatozooids
Концентрація ТБК-активних продуктів TBA-active products concentration	28,45 ± 6,36 нмоль МДА/10 ⁸ сперматозоїдів 28.45 ± 6.36 nmol MDA/10 ⁸ spermatozooids
Активність СОД SOD activity	392 ± 15 У/мл сім'яної рідини 392 ± 15 U/ml seminal fluid
Активність каталази Catalase activity	12 ± 2 У/мл сім'яної рідини 12 ± 2 U/ml seminal fluid
Активність глутатіонпероксидази Glutathionperoxidase activity	0,25 ± 0,08 мкмоль/хв на 10 ⁸ сперматозоїдів 0.25 ± 0.08 μmol/min on 10 ⁸ spermatozooids
Активність глутатіонредуктази Glutathionreductase activity	0,12 ± 0,04 мкмоль/хв на 10 ⁸ сперматозоїдів 0.12 ± 0.04 μmol/min on 10 ⁸ spermatozooids

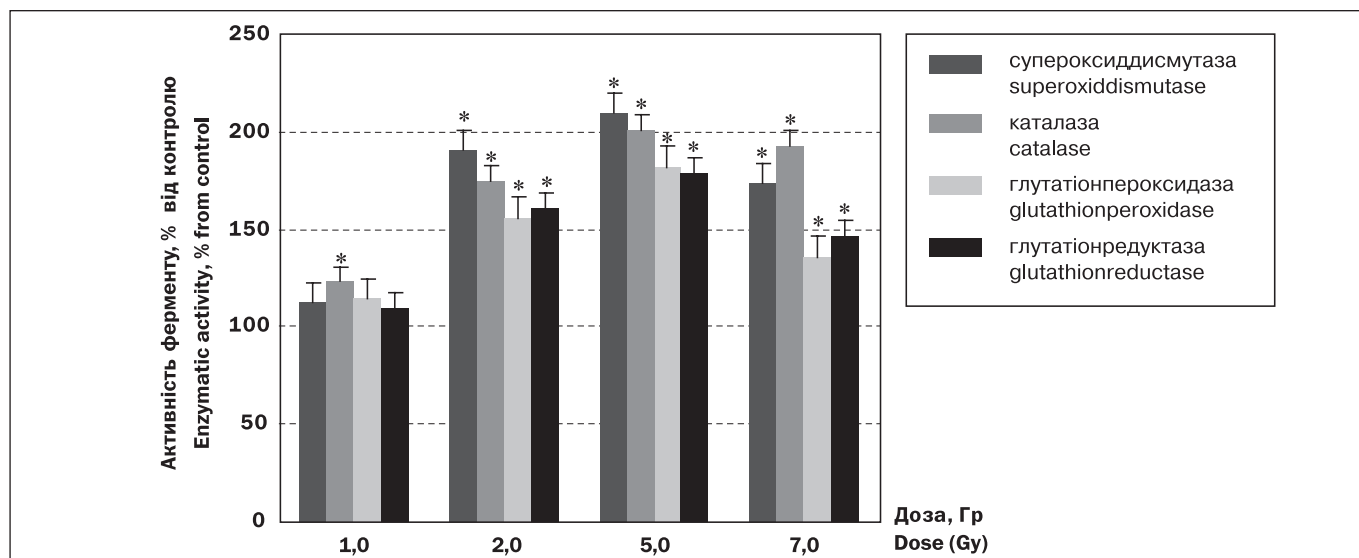


Рисунок 1. Активність антиоксидантних ферментів в сім'яній рідині кролів на 10-ту добу після їх тотального опромінення в дозах 1,0–7,0 Гр.

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Figure 1. Activities of antioxidant enzymes in rabbit seminal fluid 10 days after total-body irradiation by 1.0–7.0 Gy.

Note. * – reliable differences compared with the control, $p \leq 0.05$.

Подальшими дослідженнями було встановлено, що тотальне опромінення кролів призводило до зміни активності основних антиоксидантних ферментів. Так, активність СОД і каталази через 10 діб після опромінення тварин в дозі 1,0 Гр підвищувалась на 12 і 23 %, відповідно, порівняно з контролем (рис. 1). Така доза викликала також збільшення активності ГП та ГР на 14 та 9 %, відповідно. Зростання дози іонізуючої радіації спричиняло подальше підвищення активності всіх досліджуваних ферментів у сім'яній рідині, котра досягала максимальних значень при дозі в 5,0 Гр, при цьому опромінення тварин в дозі 7,0 Гр викликало менш виражені ефекти в порівнянні з дозою в 2,0 та 5,0 Гр.

Дослідження активності вказаних ферментів через 90 діб після тотального опромінення тварин в різних дозах виявило, що після дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр активність ГР була на рівні контролю, тоді як ГП на 3 % менше контрольного значення. В той же час активність СОД і каталази лише на декілька відсотків перевищувала контрольний рівень (рис. 2).

При опроміненні в дозі 2,0 Гр активність всіх досліджуваних ферментів також статистично не змінювалась. Зі зростанням дози іонізуючої радіації до 5,0 та 7,0 Гр відбувалось вірогідне підвищення активності антиоксидантних ферментів до 130–140 % контрольної величини, при цьому найбільш реагували на опромінення такі ферменти, як СОД та каталаза.

The next investigations showed, that total irradiation of the rabbits led to changes in activity of the main antioxidant enzymes. Thus, SOD and catalase activity 10 days after irradiation in 1.0 Gy increased on 12 % and 23 %, respectively, in comparison with control (Fig. 1). This dose led also to up-regulating of glutathionperoxidase (GP) and glutathionreductase (GR) activity on 14 % and 9 %, respectively. Enhancement of radiation dose led to following up-regulation of all studied enzymes in seminal fluid that was maximal at the dose 5.0 Gy and started to decrease at dose 7.0 Gy i.e. the effects were less pronounced than under 2.0 Gy and 5.0 Gy exposure.

Study of mentioned enzymes activity after 90 days after total irradiation of animals in different doses revealed that after dose 1.0 Gy glutathionreductase activity was on the control level, while that of glutathionperoxidase was lower than control level on 3 % and SOD and catalase were a few percents higher than in control (Fig. 2).

Under the impact of ionizing radiation with 2.0 Gy dose the activities of all studied enzymes also did not statistically change. When irradiation dose increased to 5.0 and 7.0 Gy activity of antioxidant enzymes significantly raised to 130–140 % from control value, and SOD and catalase revealed the most significant reaction on radiation exposure.

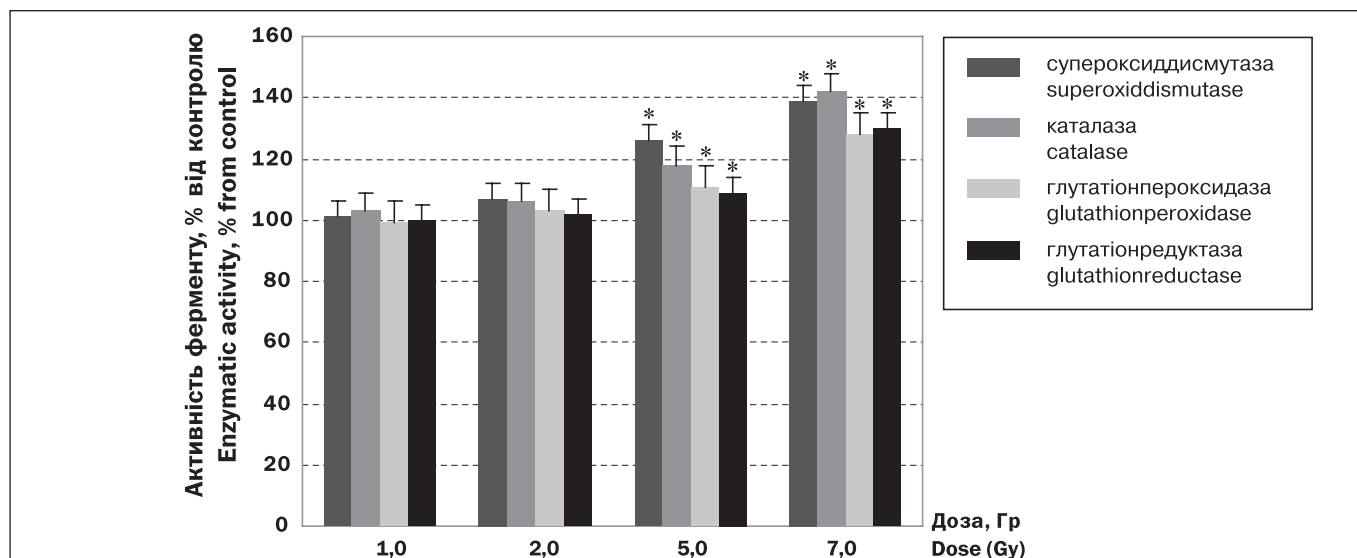


Рисунок 2. Активність антиоксидантних ферментів в сім'яній рідині кролів на 90-ту добу після їх тотального опромінення в дозах 1,0–7,0 Гр.

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Figure 2. Activities of antioxidant enzymes in rabbit seminal fluid 90 days after total-body irradiation by 1.0–7.0 Gy.

Note. * – reliable differences compared with the control, $p \leq 0.05$.

Визначення кількісних характеристик компонентів неферментативної антиоксидантної системи в сім'яній рідині сперми кролів за умов тотального рентгенівського опромінення тварин в різних дозах показало і їх чутливість до дії іонізуючої радіації.

Проведеними дослідженнями було встановлено, що на 10-ту добу після опромінення збільшення дозового навантаження на тварин призводить до суттєвого зростання концентрації відновленого глутатіону в їх сім'яній рідині (рис. 3). Так, при дозі в 1,0 Гр вміст відновленого глутатіону в сім'яній рідині підвищився майже в 2,5 раза, а при 2,0; 5,0 і 7,0 Гр – в 2,7; 3,05 та 3,11 раза, відповідно.

Одночасно рівень окисненого глутатіону з підвищенням дози тотального опромінення тварин теж виявив тенденцію до зростання, яке відбувалось більш виражено при дозах 5,0 та 7,0 Гр. Так, вміст окисненого глутатіону в першому випадку збільшився в 20 раз, а в другому – майже в 22 рази. Ці дані вказують на появу дефіциту відновлених еквівалентів при зазначених дозах.

Встановлено, що через 90 діб після тотального опромінення тварин в діапазоні доз 1,0–7,0 Гр в їх сім'яній рідині також спостерігалось пропорційне до дози зростання концентрації відновленого і окисненого глутатіону порівняно з контрольними величинами, однак воно відбувалось не так виражено (рис. 4). Тому при всіх дозових навантаженнях досліджені параметри поступались за абсолютною величиною тим, що були зафіксовані в 10-денний післярадіаційний термін.

Assay of parameters of non-enzymatic antioxidant system components of rabbit seminal fluid also revealed a susceptibility to the impact of X-ray total body irradiation of animals in different doses.

As we found in our studies the reduced glutathione concentrations in seminal plasma increased more at higher doses of irradiation than in lower ones on the 10th day after exposure (Fig. 3). Thus, in 1.0 Gy reduced glutathione levels increased almost by 2.5 times and in doses 2.0; 5.0 and 7.0 Gy – in 2.7; 3.05 and 3.11 times, respectively.

However, oxidized glutathione level also showed tendency for increase with enhancing the dose, which was more dramatic in 5.0 and 7.0 Gy. Thus, oxidized glutathione concentration increased by 20 times in 5.0 Gy and almost 22 times in 7.0 Gy. These results indicate on the appearing of reduced equivalent deficiency in doses mentioned above.

Increase of reduced and oxidized glutathione concentrations in rabbit seminal plasma compared to control meanings was observed with exposure dose enhancing from 1.0 Gy to 7.0 Gy 90 days after irradiation but it was not so dramatic (Fig. 4). That is why studied parameters in all doses were smaller than those registered 10 days after exposure.

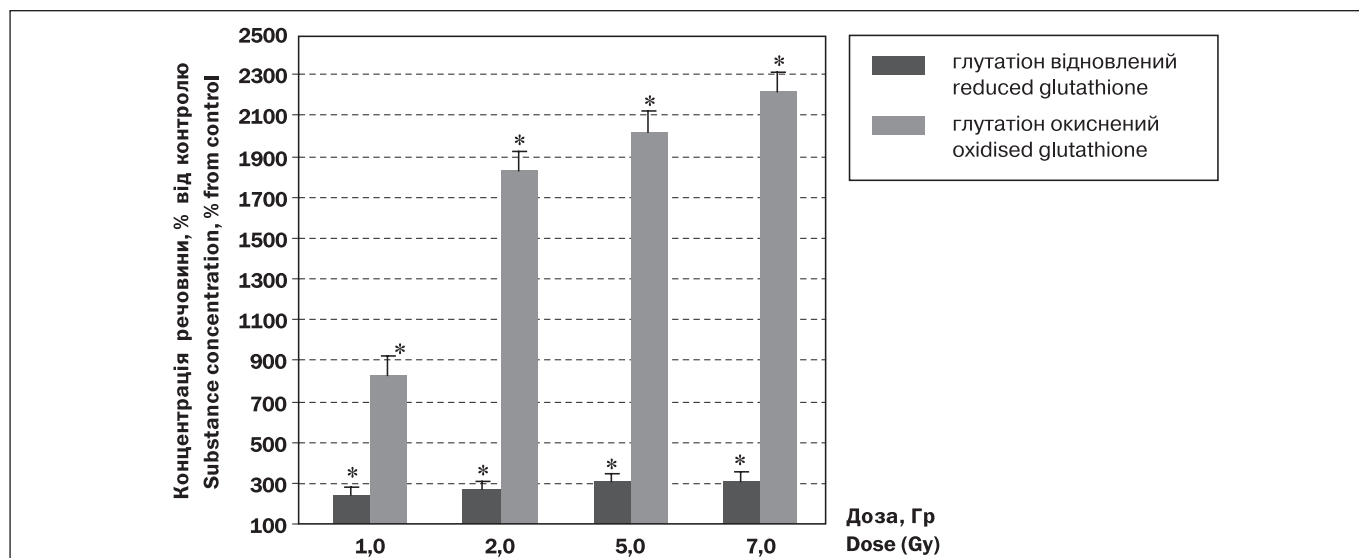


Рисунок 3. Вміст відновленого та окисненого глутатіону у сім'яній рідині сперми кролів на 10-ту добу після тотального опромінення тварин

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Figure 3. Reduced and oxidized glutathione levels in rabbit sperm 10 days after total-body irradiation of animals

Note. * – reliable differences compared with the control, $p \leq 0.05$.

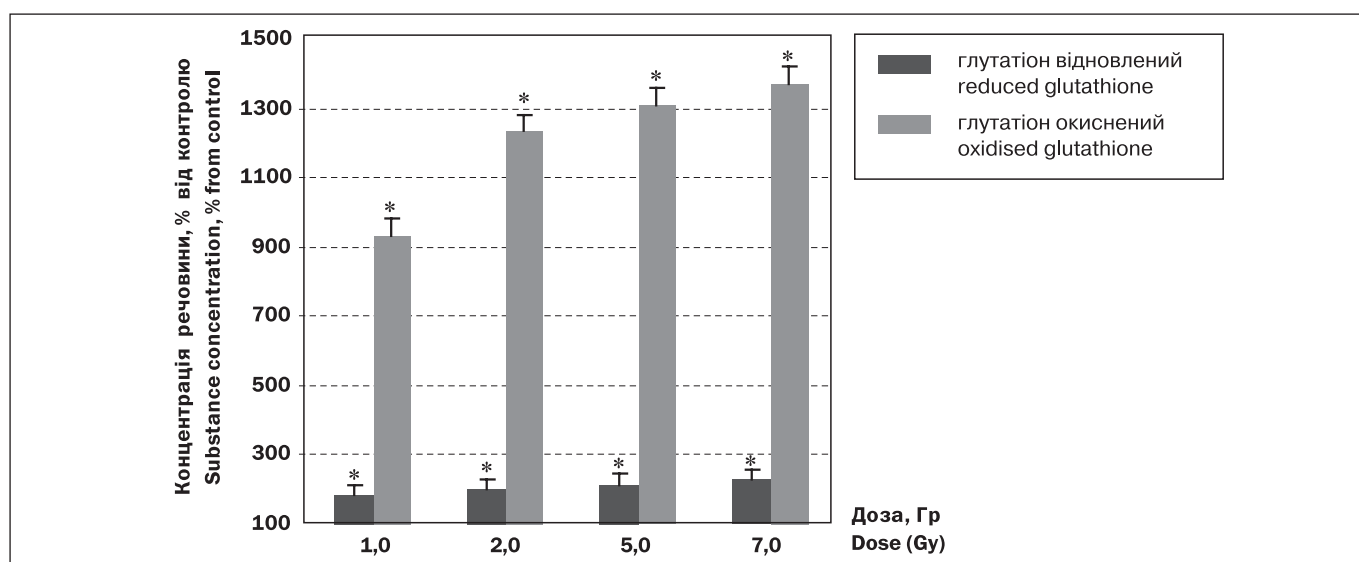


Рисунок 4. Вміст відновленого та окисненого глутатіону у сім'яній рідині сперми кролів на 90-ту добу після тотального опромінення тварин

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Figure 4. Reduced and oxidized glutathione levels in rabbit seminal fluid 90 days after total-body irradiation of animals

Note. * – reliable differences compared with the control, $p \leq 0.05$.

Збільшення концентрації відновленого і окисненого глутатіону при дозах 1,0–7,0 Гр супроводжувалось одночасним зменшенням вмісту вільних тіолових груп в сім'яній плазмі до 45–85 % контролю, а також посиленням перекисного окиснення ліпідів в перерахунку на ТБК-активні продукти до 121–194 % контрольної величини (рис. 5).

Reduced and oxidized glutathione concentrations elevation in doses 1.0–7.0 Gy was accompanied both by free thiol groups content diminishing in seminal plasma to 45–85 % from control meanings and up-regulating of lipid peroxidation, which according to TBA-active products concentration measuring was 121–194 % from control (Fig. 5).

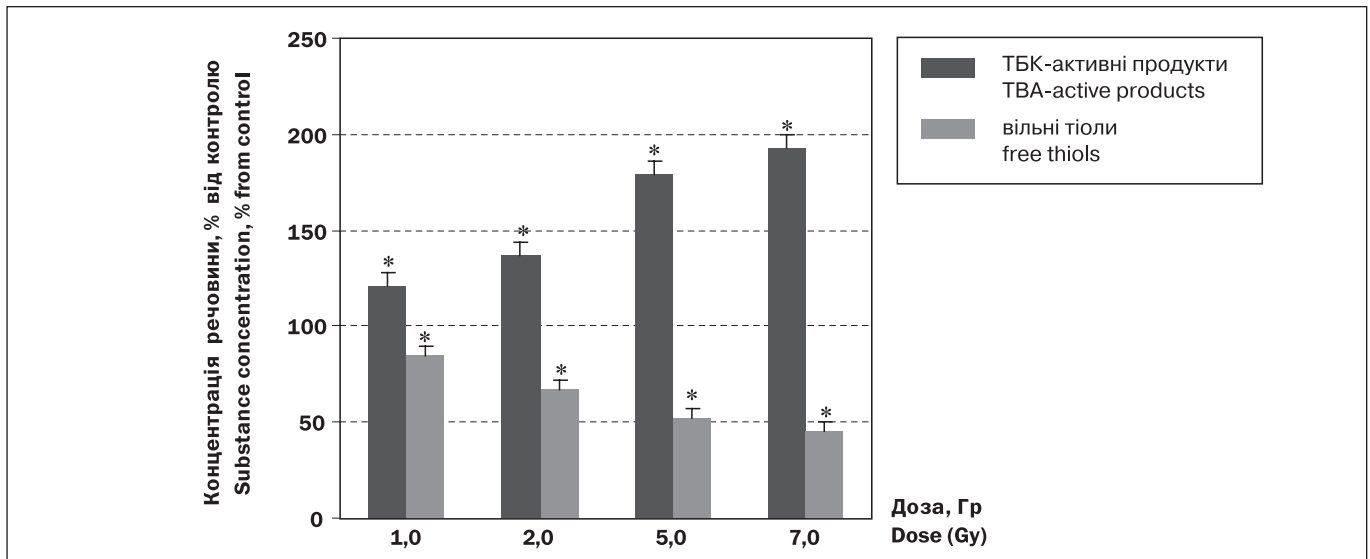


Рисунок 5. Вміст вільних тіолів та ТБК-активних продуктів у сім'яній рідині сперми кролів на 10-ту добу після тотального опромінення тварин

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Figure 5. Free thiols and TBA-active products levels in rabbit seminal fluid 10 days after total-body irradiation of animals

Note. * – reliable differences compared with the control, $p \leq 0.05$.

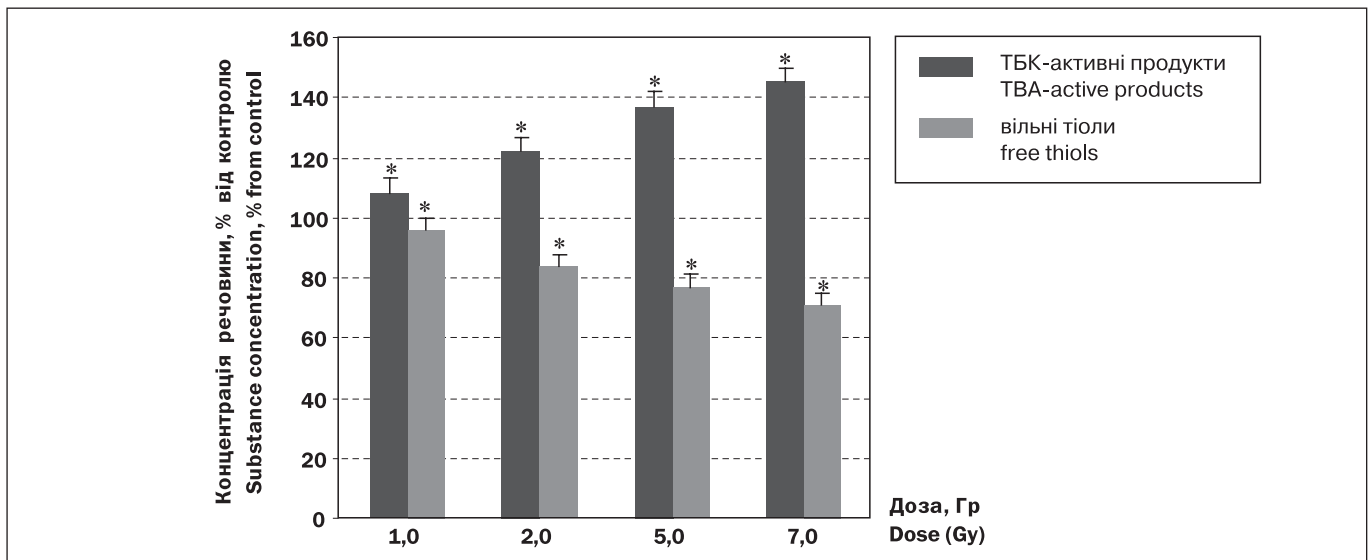


Рисунок 6. Вміст вільних тіолів та ТБК-активних продуктів у сім'яній рідині сперми кролів на 90-ту добу після тотального опромінення тварин

Примітка. * – відмінності достовірні порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

Figure 6. Free thiols and TBA-active products levels in rabbit seminal fluid 90 days after total-body irradiation of animals

Note. * – reliable differences compared with the control, $p \leq 0.05$.

Через 90 днів після тотального рентгенівського опромінення тварин спостерігалась часткова нормалізація як активності антиоксидантних ферментів, так і рівня перекисного окиснення ліпідів в сім'яній рідині кролів при всіх дозах іонізуючої радіації. Так, при дозі в 2,0 Гр вміст ТБК-активних продуктів, порівняно з періодом в 10 днів після оп-

Prolongation of post-exposure period up to 3 months upon the X-ray irradiation resulted in partial normalization of both anti-oxidant activity and lipid peroxidation level in rabbit seminal fluid in all radiation doses. Thus, at 2.0 Gy exposure TBA-active product concentration dropped by 20% in comparison with one of the 10 day period,

ромінення, знизився на 20 %, а вміст вільних тіолів, навпаки, зріс на 23 % (рис. 6).

В той же час, зі збільшенням дози опромінення до 5,0 та 7,0 Гр, вміст ТБК-активних продуктів в сім'яній рідині був підвищений, однак його абсолютна кількісна величина була меншою приблизно на 40 %, ніж при аналогічному зростанні через 10 діб після тотального опромінення тварин. Концентрація вільних тіолів в сім'яній рідині кролів на 10-ту добу мала тенденцію до зменшення з ростом дози опромінення. Така тенденція зберігалась і в 90-денний термін після дії іонізуючої радіації.

В другому випадку цей процес відбувався значно повільніше, тому при дозі в 7,0 Гр концентрація вільних тіолів в сім'яній рідині становила на 90-ту добу 77 % контрольної величини на відміну від 44 %, що була зареєстрована на 10-ту добу після дії іонізуючого випромінювання.

Таким чином, на 10-ту добу після опромінення збільшення дозового навантаження на тварин призводило до суттєвого збільшення концентрації відновленого та окисненого глутатіону в сім'яній рідині, що також супроводжувалось появою дефіциту відновлених еквівалентів при дозах вище за 2,0 Гр. За дози тотального опромінення в 2,0 Гр загальна антиоксидантна активність сім'яної рідини зменшилась до 75 %, а вміст вільних тіолових груп – до 67 % від контрольного значення, тоді як вміст ТБК-активних продуктів збільшився. Це вказує на посилення процесів перекисного окиснення ліпідів в спермі.

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

ВИСНОВКИ

1. Показано, що активність ферментативної антиоксидантної системи сім'яної рідини сперми кролів після проведення тотального опромінення тіла тварин в дозах 1,0; 2,0; 5,0 та 7,0 Гр суттєво зростала вже на 10-ту добу за всіма дослідженими параметрами (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза), а потім починала поступово зменшуватись і досягала контрольного рівня через 90 діб при дозах іонізуючої радіації 1,0 та 2,0 Гр, в той же час залишаючись дещо підвищеною для доз 5,0 та 7,0 Гр.
2. Встановлено, що неферментативна антиоксидантна система сім'яної рідини сперми кролів також швидко реагує на тотальне рентгенівське опромінення тіла тварин в діапазоні доз 1,0–7,0 Гр, що мало

but in contrast, free thiols content increased by 23 % (Fig. 6).

At the same time, when exposure dose enlarged to 5.0 Gy and 7.0 Gy, despite the growth of TBA-active products concentrations in seminal fluid, in quantitative ratio their level was smaller by 40 % than similar elevation 10 days after animals irradiation. There was a tendency to decrease of free thiols concentration simultaneously with growth of exposure dose. Such a trend remained stable in 90 days term upon the impact of ionizing radiation also.

However, the mentioned above process on 90-day period went much slowly, that is why free thiols concentration in seminal fluid on 90 day after 7.0 Gy exposure was only 77 % from control meanings, while on 10th day it was 44 % from control levels.

Thus, on 10th day after radiation exposure enhancement of dose burden on animals leads to significant increase of reduced and oxidized glutathione concentrations in seminal fluid, being accompanied by appearance of reduced equivalents deficiency in doses higher than 2.0 Gy. Meanwhile, at dose 2.0 Gy, total antioxidant activity of seminal fluid diminished to 75% from control meanings, free thiol groups content – to 67%, however, TBA-active products concentrations enlarged. This indicates amplification of lipid peroxidation processes in sperm.

Prolongation of post-exposure period to 3 months led to normalization of antioxidant activity and lipid peroxidation levels in seminal fluid of rabbits after total X-ray irradiation of animals.

CONCLUSIONS

1. Enzymatic antioxidant system activity of rabbit seminal fluid significantly increases by the 10th day after animals total-body irradiation in 1.0; 2.0; 5.0 and 7.0 Gy for all studied parameters (superoxid-dismutase, catalase, glutathionperoxidase, glutathionreductase) and then starts to drop down reaching the control level by the 90th day at exposure doses 1.0 and 2.0 Gy. However the activity of enzymatic antioxidant system remained somewhat elevated upon 5.0 and 7.0 Gy exposure.
2. Non-enzymatic antioxidant system of rabbit seminal fluid also reacts quickly on total-body X-ray irradiation in 1.0–7.0 Gy doze range that was revealed by both dose-dependant decrease of

прояв в дозозалежному зменшенні пулу вільних тіолів та відповідному збільшенні концентрації окисленого глутатіону в сім'яній рідині.

3. Визначено підвищену радіочутливість антиоксидантної системи сім'яної рідини сперми кролів до дії іонізуючої радіації, що проявлялося в швидкому реагуванні на появу молекулярних пошкоджень та продуктів радіаційного розпаду в спермі шляхом зростання активності антиоксидантних ферментів та концентрації речовин з антиоксидантними властивостями. В результаті відбувалося поступове усунення наслідків радіаційного впливу на сперму, що продовжувалось принаймі протягом трьох місяців для доз 1,0 та 2,0 Гр, а при дозах в 5,0 та 7,0 Гр – ще триваліше.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Jacquet P. Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation / P. Jacquet // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. – 2004. – Vol. 18, No. 2. – P. 106–114.
2. Occupational exposures and male infertility / C. R. Garcia, M. D. Sammel, Ch. Coutifaris [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2005. – Vol. 162, No. 8. – P. 729–733.
3. Molecular markers of human sperm functions / M. Muratori, M. Luconi, S. Marchiani [et al.] // *Int. J. Androl.* – 2009. – Vol. 32. – P. 25–45.
4. Effects of pre-exposure of mouse testis with low-dose ^{60}Co γ -rays on sperm shape abnormalities, lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) activity induced by subsequent high-dose irradiation / H. Zhang, R. L. Zheng, Q. X. Gao [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1998. – Vol. 73, No. 2. – P. 163–167.
5. Baker, M.A. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology / M. A. Baker, R. J. Aitken // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2004. – Vol. 216. – P. 47–54.
6. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple / I. M. W. Ebisch, W. H. M. Peters, C. M. G. Thomas [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 21, No. 7. – P. 1725–1733.
7. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes / Z. Lubberda // *Reprod. Biol.* – 2005. – Vol. 5, No. 1. – P. 5–17.
8. Lamirande E. Sperm activation: role of reactive oxygen and kinases / E. Lamirande, C. O'Flaherty // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1784. – P. 106–115.
9. Bannister J. V. Assays for superoxide dismutase / J. V. Bannister, L. Calabrese // *Methods Biochem. Anal.* – 1987. – Vol. 32. – P. 279–312.
10. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, М. А. Майорова, В. Е. Токарева // *Лаб. дело.* – 1988. – № 11. – С. 16–19.
11. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили ; под ред. В. Н. Орехович. – М. : Медицина, 1977. – 392 с.
12. Buege J. A. Microsomal lipid peroxidation / J. A. Buege, S. D. Aust // *Methods Enzymol.* – 1978. – Vol. 52. – P. 302–310.

free thiols pool and respective elevation of oxidized glutathione concentrations in seminal fluid.

3. Our studies found elevated radio-sensitivity of rabbit seminal antioxidant system that showed up by fast reaction on appearance of molecular damages and radiation disintegration products in sperm by up-regulation of antioxidant enzymatic activity and increased levels of substances with anti-oxidant capacities. It resulted in gradual removal of consequences of radiation influence on sperm, which lasted at least 3 months for doses 1.0 and 2.0 Gy and for doses 5.0 and 7.0 Gy – even longer.

REFERENCES

1. Jacquet P. Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 Apr-Jun;18(2):106-14.
2. Garcia CR, Sammel MD, Coutifaris Ch. Occupational exposures and male infertility. *Am. J. Epidemiol*. 2005 Oct 15;162(8):729-33.
3. Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Molecular markers of human sperm functions. *Int J Androl*. 2009 Feb;32(1):25-45.
4. Zhang H, Zheng RL, Wei ZQ, Li WJ, Gao QX, Chen WQ, et al. Effects of pre-exposure of mouse testis with low-dose ^{60}Co γ -rays on sperm shape abnormalities, lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) activity induced by subsequent high-dose irradiation. *Int J Radiat Biol*. 1998 Feb;73(2):163-7.
5. Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Mar 15;216(1-2):47-54.
6. Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod*. 2006 Jul;21(7):1725-33.
7. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*. 2005 Mar;5(1):5-17.
8. de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen and kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan;1784(1):106-15.
9. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
10. Koroljuk MA, Ivanova LI, Majorova MA, Tokareva VE. [Method of determination of catalase activity]. *Lab Delo*. 1988.(11):16-9. Russian.
11. Stal'naja ID, Garishvil TG; Orehovich VN, editor. [Modern methods of biochemistry]. Moskva: Meditsina;1977. 392 p. Russian.
12. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.

13. Anderson M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples / M. E. Anderson // Methods Enzymol. – 1985. – Vol. 113. – P. 548–555.

14. Hu M. L. Measurement of protein free sulphhydryl groups and glutathione in plasma / M. L. Hu// Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 223. – P. 380–385.

15. Bland M. An introduction to medical statistics. – 3rd edit. – Oxford : Oxford Univ. Press, 2007. – 405 p.

13. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol. 1985;113:548-55.

14. Hu ML. Measurement of protein free sulphhydryl groups and glutathione in plasma. Methods Enzymol. 1994;223:380-5.

15. Bland M. An introduction to medical statistics. 3rd ed. Oxford: Oxford Univ. Press; 2007. 405 p.

Стаття надійшла до редакції 15.08.2014

Received: 15.08.2014