

ДО ОЦІНЮВАННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІМЕРНИХ ВИРОБІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕСТ-ОБ'ЄКТУ — СПЕРМІЇВ БУГАЇВ

В. П. Музика¹, І. С. Атаманюк¹, О. І. Чайковська¹, О. П. Панич¹, О. І. Сергієнко¹, Д. Д. Остапів²,
І. М. Яремчук², Н. В. Кузьміна², Р. Д. Остапів²

¹Державний науково-дослідний контрольний
інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

²Інститут біології тварин НААН

Вивчали можливість оцінювання цитотоксичної дії полімерних виробів з використання сперміїв бугаїв. Виявлено, що цитотоксична дія полімерів, які використовуються у практиці штучного осіменіння тварин, за їх прямого контакту зі статевими клітинами впродовж 24 год характеризується порушенням окисних процесів у спермії і проявляється зменшенням споживання кисню, дисбалансом у ланках ланцюга мітохондрій, розчепленням білків, зниженням активності супероксиддисмутази та виживання сперміїв. Для прискореного оцінювання цитотоксичності та встановлення доцільності застосування новостворених матеріалів полімерної природи у практиці ветеринарної медицини необхідно проводити комплексне вивчення їх біологічної дії з використанням сперміїв бугаїв та показників окисних процесів.

Ключові слова: ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ, ОКИСНІ ПРОЦЕСИ, ДИХАЛЬНА АКТИВНІСТЬ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, АСПАРТАТАМІНОТРАНСФЕРАЗА, ВИЖИВАННЯ, ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, СПЕРМІЇ, БУГАЙ.

На даний час відсутні прості й швидкі способи оцінювання цитотоксичної дії новостворених і широко використовуваних матеріалів синтетичного походження, які застосовуються в різних галузях виробництва, у тому числі й ветеринарній медицині та зоотехнії. Дослідженнями встановлено, що перспективним способом виявлення цитотоксичності є вивчення виживання сперміїв бугаїв за впливу полімерних виробів [1]. При цьому, ефективнішим для оцінювання є застосування водних екстрактів з полімерів. Проте, використання показника абсолютного виживання сперміїв для встановлення цитотоксичності матеріалів вимагає тривалих у часі досліджень (2–10 діб). Як маркери прискореного і вірогідного оцінювання дії полімерів на клітини, в тому числі й сперми, заслуговують на увагу окисні процеси. Вивчення вказаних процесів надає найбільш вірогідну інформацію про інтенсивність метаболізму і визначає та характеризує фізіологічний стан біологічних об'єктів, зокрема, статевих клітин [2]. Доведено, що інтенсивність споживання кисню клітинами, спермою і сперміями, активність ферментів, які приймають участь у ресинтезі АТФ адекватно змінюються умовам досліду: за додавання важких металів, аліфатичних спиртів, бензолу, ксилолу, субстратів та біологічно активних речовин у середовища інкубування [3–6]. Крім того, безпосередню роль в регулюванні окисного балансу і фізіологічних характеристик сперміїв відіграє антиоксидантна система сперми і, зокрема, активність супероксиддисмутази (СОД) [7]. Зростання чи зниження активності СОД свідчить про дисбаланс між інтенсивністю утворення та перетворення супероксиданіонів і, відповідно, про підвищення перекисного окиснення ненасичених жирних кислот ліпідів мембран, їх руйнування та зниження резистентності і рухливості сперміїв [8, 9]. Порушення відношення ліпід : білок, внаслідок окиснення перших, призводить до витоку протеїнів з мембран і внутрішньоклітинних ферментів зі сперміїв, зростання їх розчинних форм і активування у середовищах інкубування (зберігання), що, своєю чергою, призводить до зниження фізіологічних показників сперміїв і їх загибелі [10].

Отже, з вищенаведених джерел літератури випливає, що окисні процеси можуть об'єктивно характеризувати цитотоксичний вплив полімерних виробів на метаболізм статевих клітин і прогнозувати їх дію на обмінні процеси в організмі тварин і людини.

Мета роботи — вивчити можливість застосування показників інтенсивності окисних процесів у розрідженій спермії бугаїв для оцінювання цитотоксичної дії полімерних матеріалів, що застосовуються в практиці штучного осіменіння.

Матеріали і методи

Для вивчення цитотоксичної дії полімерів на спермії бугаїв використано гуму штучних вагін і катетери для штучного осіменіння та метод прямого контакту статевих клітин з вказаними матеріалами. Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв таких фізіологічних характеристик: об'єм 2–5 мл, концентрація сперміїв $0,8\text{--}1,2 \times 10^9$ клітин /мл, кількість живих статевих клітин 65–89 %. Для оцінювання і характеристики дії полімерів проби сперми ділили на: контрольну — розріджену 1:10 цитратно-жовтковим розріджувачем (ЦЖР) та дослідні — з додаванням у ЦЖР 3–4 % подрібнених матеріалів катетера та вагіни. Визначали: виживання сперміїв (год.) до припинення прямолінійного

поступального руху в збереженій при температурі 2–5°C спермі; біохімічні показники через 24 год інкубування (зберігання) сперми: дихальну активність — полярографічно (нг-атом O/(хв • 0,1 мл сперми; С) за температури 38,5°C; активність ферментів: сукцинатдегідрогенази (СДГ, од) і цитохромоксидази (ЦХО, од) [11], супероксиддисмутази (МО/мг протеїну) [12] у нашій модифікації і аспартатамінотрансферази (АСТ, нмоль/хв×мг білка) [13].

Для виявлення цитотоксичної дії досліджуваних матеріалів при інкубуванні сперми на процеси дихання використовували інгібітори: гліколізу — натрію фторид (NaF; 10⁻³М); ланцюга дихання мітохондрій сперміїв: НАД-залежної ланки — амітал (АМ; 5×10⁻³М) і термінальної (ЦХО) — натрію азид (NaN₃; АЗ — 5×10⁻²М). Вільнорадикальне окиснення ненасичених жирних кислот інгібували Na₂ЕДТА (0,6×10⁻³М) [14]. Для встановлення особливостей спектру білків інкубованих проб сперми проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі. Вміст загального білка визначали з реактивом Фоліна [15]. Статистичний аналіз отриманого матеріалу проведено за М. О. Плохінським [16].

Результати й обговорення

Виживання сперміїв у спермі за прямого контакту полімерних матеріалів понижене. При цьому, дія цитотоксичних продуктів катетера для штучного осіменіння корів знижує величину фізіологічного показника на 13,8 %, а вагіни — на 24,2 %, порівняно з контролем (табл.).

Таблиця

Виживання сперміїв та інтенсивність окисних процесів у спермі бугаїв за присутності полімерів у розріджувачі еякулятів, (n = 6; M ± m)

Показники	Умови інкубування сперми		
	Контроль (ЦЖР)	ЦЖР + катетер	ЦЖР + вагіна
Виживання сперміїв, год	139,2± 29,12	120,0±27,15	105,6±16,06
Споживання кисню, нг-атом O/(хв×0,1 мл С	7,3±1,91	5,3±1,09	6,7±2,99
СДГ, од	13,3±1,36	6,7±1,63**	8,3±1,37*
ЦХО, од	6,7±1,45	8,3±1,33	11,7±1,36*
Активність СОД, МО/мг білка	5,7±0,20	3,1±0,20***	2,3±0,24***
Активність АСТ, нмоль/хв×мг білка	56,6±3,75	73,3±6,36*	85,5±6,79**

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

Подібними змінами характеризується вплив матеріалів на величини значень біохімічних показників. Зокрема, інтенсивність споживання кисню спермою за присутності матеріалів катетера нижча на 27,4 % і вагіни — на 8,3 %, порівняно з контролем (рис. 1.).

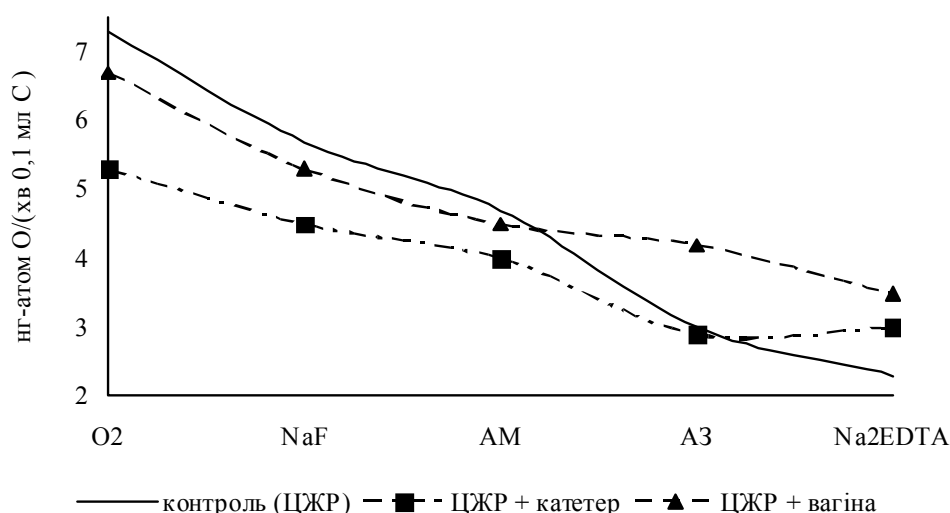


Рис. 1. Особливості споживання кисню спермою за дії полімерних матеріалів та інгібіторів

Таким чином, полімери за прямого контакту зі статевими клітинами проявляють цитотоксичний вплив, який характеризується пониженою інтенсивністю окисних процесів, ймовірно, зниженим функціонуванням ланцюга дихання мітохондрій і ресинтезом АТФ, що зумовлює втрату рухливості і зменшенням тривалості виживання сперміїв.

Використання інгібіторів виявило особливості впливу досліджуваних матеріалів на споживання кисню за рахунок енергогенеруючих процесів і окремих ланок ланцюга дихання мітохондрій спермійв. Так, дія інгібітора гліколізу знижує інтенсивність споживання кисню статевими клітинами у контролі та за дії гуми вагіни на однакову величину (20,9 і 21,9 %) і менше (15,1 %) — за впливу полімерів катетера. Отже, полімери катетера та їх продукти, що екстрагуються у розріджувач сперми, гальмують активність аеробного гліколізу спермійв.

За дії досліджуваних матеріалів гальмується активність НАД-залежної ланки ланцюга дихання мітохондрій спермійв: споживання кисню нижче на 6,4 % у присутності полімерів катетера і на 2,5 % — вагіни, порівняно з контролем. Таким чином, за прямого контакту пластмаса катетера і гума вагіни та їх цитотоксичні продукти, що екстрагуються у розріджувач сперми, гальмують активність НАД-залежної ланки ланцюга дихання мітохондрій спермійв. При цьому, вказані матеріали інгібують активність ферменту циклу трикарбонових кислот — СДГ, який постачає електрони у НАД- і ФАД-залежні ланки ланцюга дихання. За дії пластмаси катетера активність ферменту нижча на 49,7 % і гуми вагіни — на 37,6 %, порівняно з контролем.

Полімерні матеріали, що використовуються у практиці штучного осіменіння впливають на активність термінальної ланки ланцюга дихання мітохондрій спермійв. Так, у вказаній ланці ланцюга дихання реалізується у контролі і за присутності у розрідженій спермі пластмаси катетера однакова кількість кисню (2,9–3,0 нг-атом $O/(xv \cdot 0,1 \text{ мл } C)$) і на 26,8 % вища за додавання гуми вагіни. При цьому, активність ЦХО у дослідних пробах вища — на 19,3 % за дії полімерів катетера і на 42,8 % — вагіни, порівняно з контролем. Виявлені зміни активності ферменту, ймовірно, зумовлені ушкодженням мембран мітохондрій і виходом ЦХО у позаклітинний простір.

Використання інгібітора вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот свідчить про гальмування процесів перекисного окиснення за дії доданих до розрідженої сперми полімерів. Так, додавання Na_2EDTA не змінює інтенсивність дихання за впливу матеріалів катетера (3,0 нг-атом $O/(xv \cdot 0,1 \text{ мл } C)$) і знижує за присутності гуми вагіни та у контролі, відповідно, на 16,6 % (3,5 нг-атом $O/(xv \cdot 0,1 \text{ мл } C)$) і 23,3 % (2,3 нг-атом $O/(xv \cdot 0,1 \text{ мл } C)$), порівняно з споживанням кисню за рахунок термінальної ланки ланцюга дихання. Поряд зі зменшенням інтенсивності процесів перекисного окиснення у спермі за дії полімерів гальмується й активність СОД, яка нижча на 45,7 % у пробах з полімерами катетера і на 59,7 % — вагіни, порівняно з контролем. Отже, дія доданих у розріджену сперму полімерних матеріалів пригнічує першу ланку антиоксидантної системи, яка утилізує супероксиданіон та процеси пов'язані з модифікацією мембран статевих клітин, що, своєю чергою, може гальмувати капацитацію і акросомну реакцію, запліднення ооцита сперміями.

Особливістю впливу досліджених полімерів на дихальну активність сперми є значне зростання вільного окиснення. Так, у контролі величина вказаного показника становить 31,5 %, а за впливу полімерів катетера — 56,6 % і вагіни — 52,2 % від загальної кількості спожитого кисню. Висока величина вільного окиснення свідчить про підвищення немітохондрійних окисних процесів й можливі модифікування білків сперми і білкових компонентів розріджувача.

Отримані результати стосовно зростання вільного окиснення і можливого модифікування білкових компонентів розрідженої сперми підтверджуються змінами спектру розчинних білків за присутності полімерів. Як видно з електрофореграм, у розрідженій спермі цитотоксична дія полімерів зумовлює зниження вмісту загального білка та його окремих фракцій: інтенсивність зафарбування треків білків та окремих зон (γ -, β - і α -глобулінових фракцій, альбуміну, пост-альбумінів) у дослідних пробах значно нижча, порівняно з контролем (рис. 2.).

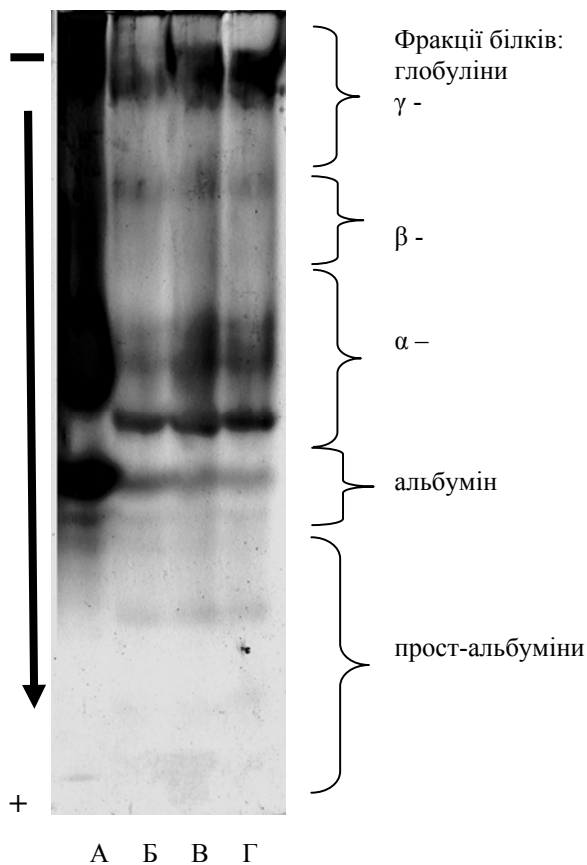


Рис. 2. Спектр білків розрідженої сперми бугаїв за дії полімерів. Умови досліду (7,5 % ПААГ): А — сперма розріджена ЦЖР (контроль); Б — ЦЖР + пластмаса катетера; В — ЦЖР + гума вагіни; Г — ЦЖР.

У зоні пост-альбумінів з'являються білки з малим розміром молекул і високою електрофоретичною рухливістю. Отже, цитотоксична дія полімерних матеріалів також спрямована на білки сперми і статевих клітин.

Про підвищене окиснення білків спермій, зокрема їх мембран, свідчить зростання активності АСТ на 22,8 % за дії полімерів катетера і на 33,9 % — вагіни, порівняно з контролем.

Висновки

1. Цитотоксична дія полімерів катетера і вагіни характеризується порушенням окисних процесів у спермі, що проявляється зменшенням споживання кисню спермою, дисбалансом енергогенеруючих процесів у сперміях, розчепленням білків, зниженням активності СОД та виживання статевих клітин.

2. Для прискореного оцінювання цитотоксичності та придатності для застосування новостворених матеріалів полімерної природи у практиці ветеринарної медицини доцільно проводити комплексне вивчення їх біологічної дії з використанням як тест-об'єкту сперми (спермій) бугаїв та показників окисних процесів.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно вивчити цитотоксичний вплив полімерних матеріалів на клітини організму тварин, які володіють здатністю продукувати біологічно активні речовини.

*V. P. Muzyka, I. S. Atamanyuk, O. I. Chaikovska, O. P. Panich, O. I. Serhienko,
D. D. Ostapiv, I. M. Yaremchuk, N. V. Kuzmina, R. D. Ostapiv*

TO THE ASSESSMENT OF CYTOTOXIC POLYMER PRODUCTS USING TESTING OBJECT — BULL SPERM

S u m m a r y

Possibility of bull semen appliance as a test object to rate cytotoxicity of polymer products has been studied. It is revealed that cytotoxic effect of polymers, used in artificial insemination, in direct contact with spermatozoa within 24 hours is characterized by violation of oxidative processes in semen, which is manifested by lowered consumption of oxygen, misbalance in mitochondrial respiratory chain links, protein decomposition, and lowered activity of superoxide dismutase and survival of spermatozoa. For faster assessment of cytotoxicity and to establish the feasibility of using new made materials from polymers in practice of veterinary medicine we need to conduct complex study of biological effect using bull sperm as test object and indexes of oxidative processes.

В. П. Музыка, И. Е. Атаманюк, А. И. Чайковская, А. П. Панич, А. И. Сергиенко,
Д. Д. Остапів, И. М. Ярмчук, Н. В. Кузьмина, Р. Д. Остапів

К ОЦЕНКЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ИЗДЕЛИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-ОБЪЕКТА — СПЕРМИЕВ БЫКОВ

А н н о т а ц и я

Изучали возможность оценки цитотоксического действия полимерных изделий с использованием спермы (спермиев) быков в качестве тест-объекта. Выявлено, что цитотоксическое действие полимеров, которые используются в практике искусственного осеменения животных при их прямом контакте с половыми клетками на протяжении 24 час. характеризуется нарушением окислительных процессов в сперме и проявляется снижением использования кислорода, дисбалансом в звеньях цепи митохондрий, расщеплением белков, снижением активности супероксиддисмутазы и выживания спермиев. Для ускоренной оценки цитотоксичности и установления возможности использования новосозданных материалов полимерной природы в практике ветеринарной медицины нужно проводить комплексное изучение их биологического действия с использованием тест-объекта спермы (спермиев) быков и показателей окислительных процессов.

1. Музыка В.П. Оцінювання цитотоксичної дії полімерних виробів з використанням тест-об'єкту — спермійв бугаїв./ Музыка В.П., Атаманюк І.С., Чайковська О.І. та ін. //НТБ ІБТ НААН. — 2011. — Вип. 12, № 1, 2. — С.367–370.
2. Косенко М. В. Репродуктивна функція і андрологічна диспансеризація бугаїв / М. В. Косенко, Б. М. Чухрій, І. Я Коцюмбас, та ін. — Львів, 2007. — 186 с.
3. De Caimmi T. Oxidation de substratos y lactato deshidrogeasa mitocondrial en semen bovino congelado / De Caimmi T. Beorlegui A., Beconi N. // Rev. med. veter. — 1986. — Vol. 67. — P.108–110.
4. Ілющенко В. П. Быстрое тестирование токсичности, основанное на определении респираторной активности сперматозоидов и (или) инфузорий // Экология. — 1995. — № 1. — С. 63–67.
5. Garrett L. J. A. ATP Production by Bovine Spermatozoa and Its Relationship to Semen Fertilizing Ability / Garrett L. J. A., Revell S. G., Leese H. J. //Journal of Andrology. — 2008. — Vol. 29. — P. 449–458.
6. Edwards S. E. Effects of Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate on Human Sperm Motility / Edwards S. E., Buffone M. G., Knee G. R. // Reproductive Sciences. — 2007. — Vol. 14, No. 7. — P. 655–666.
7. Eghbali M. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. / Eghbali M., Alavi-Shoushtari S. M., Rezaii S. A. // Pak. J. Biol. Sci. — 2008. — Vol.11. — P.1964–1968.
8. Neagu V. R. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw / Neagu V. R., Garcia B. M., Rodriguez A. M., et. al. // Theriogenology. — 2011. — Vol.75. — P. 1010–1016.
9. De Lamirande E. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility / De Lamirande E., Gagnon C. // J. Andrology. — 1992. — Vol.13. — P.379–386.
10. Al-Tha T. J. Kriobiochemizne zmiany plemnikow buhajow w warunkach technologii mrozenia nasienia stosowanej w zaklaziе unasienniana / Al-Tha T. J., Strzerek J. // Plodnosc i niepłodnosc zwieząt domowych. — 1986. — Vol.12. — P.199–216.
11. Чухрій Б. М. До методики визначення активності окислювальних ферментів у спермі бугаїв / Чухрій Б. М., Клевець Л. О. // Розведення та штучне осіменіння великої рогатої худоби. — 1978. — Вип. 10. — С. 42–45.
12. Чевари С. Н. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / Чевари С. Н., Андян Т. А. Штрэнгер Я. И. // Лаб. дело. — 1991. — №10. — С.9–13.
13. Reitmann S. A colorimetric meethod for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic puruvic transaminases. / Reitmann S., Frankel S. // Amer. J. Clin. Path. — 1957. — Vol. 28, No. 1. — P. 56–63.
14. Орехович В. Н. Методы измерения дыхательной активности микросом / Современные методы в биохимии // В. Н. Орехович. — М. : Медицина, 1977. — С. 59–60.
15. Lowry O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, No. 1. — P.264–275.
16. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. — М. : Колос, 1969. — 255с.

Рецензент: профессор, доктор біологічних наук О. Г. Малик, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.