

УДК 546.49:619:615.9:636.22:57.08

**АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСУ
ТА РЕПРОДУКТИВНА ЗДАТНІСТЬ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ
ПРЕПАРАТУ СЕЛЕНУ.**

С. В. Федорова,

І. І. Гевкан, кандидат біолог. наук

Інститут біології тварин УАА, м. Львів

В статті описано вплив селеновмісного препарату на антиоксидантний статус організму щурів на ранніх стадіях вагітності. Показано позитивний вплив селену на процеси імплантації в умовах введення препарату до запліднення. Виявлено, що надлишкове введення селену повторно після запліднення на ранніх стадіях вагітності впливає на імплантацію негативно. Аналогічно репродуктивної функції, антиоксидантний захист організму активується також за умови введення препарату до запліднення та має самий низький рівень при надлишковому надходженні селену.

Ключові слова: антиоксидантний захист селен, запліднення.

Вступ. Вільнорадикальне окислення є одним з універсальних механізмів пошкодження клітин, але і разом з тим це необхідний для нормального функціонування клітин процес. Утворення O_2 та інших активних кисневих форм забезпечує цитотоксичну дію фагоцитів, регулює механізми поділу клітин, попереджує злоякісну трансформацію клітин, модулює апоптоз, регулює синтез ряду біологічно активних речовин [1]. Порушення антиоксидантного захисту характеризується розвитком вільнорадикальних ушкоджень різних компонентів клітин і тканин, що веде до ушкодження мембран, інактивації або трансформації ферментів, пригнічення поділів клітин, накопичення в клітині інертних продуктів полімеризації. Накопичення активних форм кисню та інших пероксидантів може викликати так званий оксидативний стрес, що ускладнює перебіг різних фізіологічних процесів. До таких процесів відносять також раннє становлення вагітності і саме імплантацію, як один з критичних періодів ембріонального розвитку. Неконтрольоване аутоокислення в клітинах гальмується фізіологічною антиоксидантною системою, до складу якої входять три основних ферменти – глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза і каталаза [2,4].

Загальновідомо, що селен є одним із важливих антиоксидантів, тобто агентом, який сприяє детоксикації реакційноздатних похідних кисню в організмі [6]. У природних умовах селен поступає в організм тварин у вигляді селеновмісних амінокислот – селенметіоніна і селенцистеїна. Штучне постачання організму селеном при його аліментарному дефіциті може здійснюватись у формі селеніту або селеніту натрію. При низькому вмісті селену в організмі при вагітності різко зростає ембріональна смертність і збільшується кількість нащадків з різними вадами розвитку [3]. Родова слабкість напряму пов'язана з недостатністю селену в організмі [7]. Рівень селену при вагітності знижується не тільки через недостатнє надходження з їжею і водою, але і через посилення обмінних процесів, необхідних для

формування плоду. Існує пряма кореляція між зниженням рівня селену в плазмі вагітних та рівня селену у крові наступних генерацій тварин даного регіону. Дефіцит селену у плодів викликає гіпоксію та виникнення порушень у дихальній системі. При нормалізації рівня селену вагітність протікає, як правило, нормально, відбувається профілактика таких ускладнень, як порушення імплантації і викидні [5]. Саме тому метою нашої роботи було довести позитивний вплив введення селенвмісного препарату на антиоксидантні процеси на ранніх стадіях вагітності та настання імплантації.

Матеріал та методи досліджень. В експерименті використовувались білі лабораторні щурі лінії Вістар віком 6-7 місяців. Тварини утримувались на стандартному раціоні. Селенвмісний препарат з метою забезпечення пролонгованої дії вводили підшкірно. Він складався з селеніту натрію в дозі 15 мкг на щура, депонуючої речовини та 2%-го розчину синьої туші в об'ємі 1 см³. До початку основного експерименту проводили пошуковий дослід для з'ясування переносимості препарату дослідним тваринами та терміну його повного розсмоктування. Після одноразового введення препарату трьом дослідним щурам та спостереженням за тваринами встановлено, що його повне розсмоктування настає впродовж трьох днів після введення. Одержані дані були використані для проведення досліджень впливу розробленого препарату згідно нижчинаведеної схеми на стимуляцію ембріонально-маткових взаємодій та забезпечення організму вагітних щурів селеном.

1.Схема досліджень по застосуванню препарату селену на ранніх стадіях вагітності у лабораторних щурів при стимуляції суперовуляції за стандартною схемою.

Групи тварин	Гормональна обробка тварин		Підсадка самців (2 самця на 5 самок)	Введення селенвмісного препарату	
	Введення препарату ФСГ	Введення препарату хоріогонічного гормону через 48 год після введення ФСГ		До запліднення	Після запліднення
Контрольна	20 МО на 1 самицю	30 МО на 1 самицю	Через 3 години після введення ХГЧ	-	-
Дослідна 1	20 МО на 1 самицю	30 МО на 1 самицю	Через 3 години після введення ХГЧ	3 рази	-
Дослідна 2	20 МО на 1 самицю	30 МО на 1 самицю	Через 3 години після введення ХГЧ	3 рази	2 рази

Всі групи тварин оброблялись гормонами для стимуляції статевої охоти за стандартною схемою: ФСГ (препарат «Фолімаг», Мосагrogen), через 48 годин хоріогонічний гормон (препарат ПРЕГНИЛ[®], [Organon](#)). Підсадку самців проводили через 2-3 години після введення хоріогонічного гормону. Через 24 години перевіряли наявність копулятивних корків. При виявленні корків вважали цей день днем запліднення. Кожна група тварин складалась з 5 самок. На 9-й день після запліднення (імплантація у щурів відбувається на 7-7,5 день

вагітності) самок забивали шляхом декапітації після передозування ефірного наркозу. Проводили морфометричну оцінку репродуктивних органів та візуально виявляли наявність зон імплантації. Результати фіксували фотокамерою. Відбирали кров для визначення рівня активності глутатіонпероксидази, каталази та відновленого глутатіону. Визначення каталазної активності проводили за методом Королук М.А. (1988) по здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдату стійкий кольоровий комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на приладі Spеsol при довжині хвилі $\lambda=410$ нм. Глутатіонпероксидазну активність визначали за методом Моїна В.М. (1986), де мірою активності ферменту є швидкість окислення глутатіону у приступності гідроперекису третинного бутилу. Концентрацію відновленого глутатіону до і після інкубації визначають колориметрично при довжині хвилі $\lambda=412$ нм. Вміст відновленого глутатіону визначали за методом Баталер, Дюпон, Келлі (1982) за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою при довжині хвилі $\lambda=412$ нм. Статистичну обробку результатів досліджень проводили стандартними параметричними методами.

Результати досліджень. По результатам морфологічної оцінки репродуктивних органів не виявлено суттєвої різниці між масою матки і яєчників у різних групах тварин (табл.2). В місцях підшкірного введення препарату на третій день після його ін'єкції, під час забою у шурів другої дослідної групи (п'ять ін'єкцій препарату) виявлено лише незначні сліди туші – препарат повністю засвоювався. Не відмічено також і будь-яких зон некрозу, або припухлості в місцях ведення препарату.

Встановлено, що найбільша кількість запліднених шурів виявляється у тварин першої дослідної групи, яким препарат селену вводили три рази до запліднення. В другій дослідній групі кількість зон імплантацій дещо знижується. Очевидно підвищений вміст селену після запліднення негативно впливає на репродуктивну здатність тварин – хоча, можливо запліднення яйцеклітин відбувалось, але рівень нідації ембріонів знижувався і на 9-й день після запліднення зон імплантацій було виявлено менше.

2. Результати морфологічної оцінки репродуктивних органів самок щурів за умов введення препарату селену при стимуляції суперовуляції у щурів за стандартною схемою ФСГ з хоріогонічним гормоном.

Групи тварин	Матка	Яєчники		Додаткові спостереження
		лівий	правий	
Контроль	0,97±0,164	0,614±0,03	0,748±0,24	Виявлено 4 вагітних самки.
Дослідна 1	0,938±0,26	0,568±0,04	0,502±0,05	Всі самки дослідної групи виявились вагітними.
Дослідна 2	1,476±0,51	0,562±0,06	0,622±0,08	Виявлено 2 вагітних самки.

Доказом доцільності такої схеми введення препарату є також і вагітності, більша кількість яких спостерігалась у самок саме цієї групи. Оскільки глутатіонпероксидаза і каталаза є основними ферментами так званої глутатіонової антиоксидантної системи, можна стверджувати, що введення препаратів селену позитивно впливає на підсилення антиоксидантного захисту у щурів на ранніх стадіях вагітності.

Виявлені морфометричні особливості імплантації ембріонів при застосуванні підшкірного введення пролонгованого препарату селену в обох дослідних групах підтверджуються змінами в них активностей ферментів антиоксидантного статусу (рис.3, 4, 5). Так, при дослідженні антиоксидантного статусу організму щурів виявлено підвищення активності ферментів глутатіонпероксидази та каталази у тварин тих дослідних груп, які отримували препарат до запліднення (рис. 3,4).



Рис.1. Вагітна матка самки щура з 9-ма зонами імплантації.



Рис.2. Вагітна матка самки щура з 2-ма зонами імплантації.

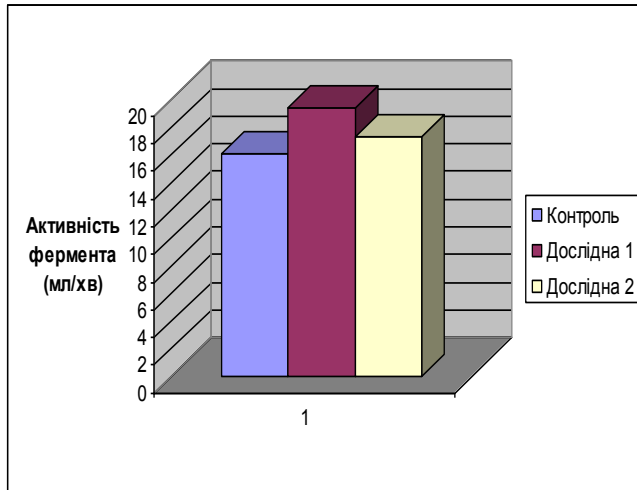


Рис.3. Активність глутатіонпероксидази у самок щурів на 9-й день після запліднення за умов введення препарату селену.

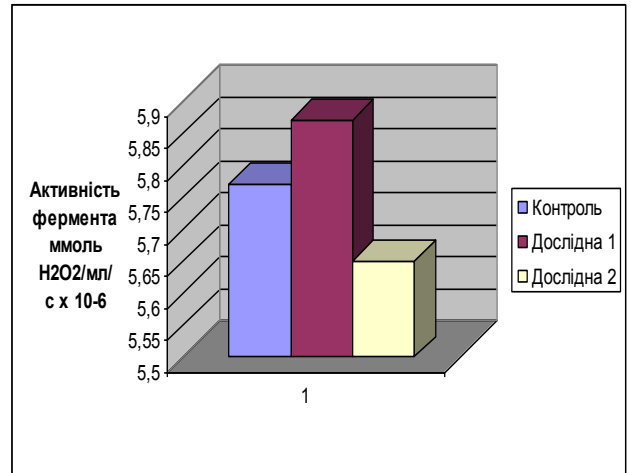


Рис.4. Активність каталази у крові самок щурів на 9-й день після запліднення за умов введення препарату селену.

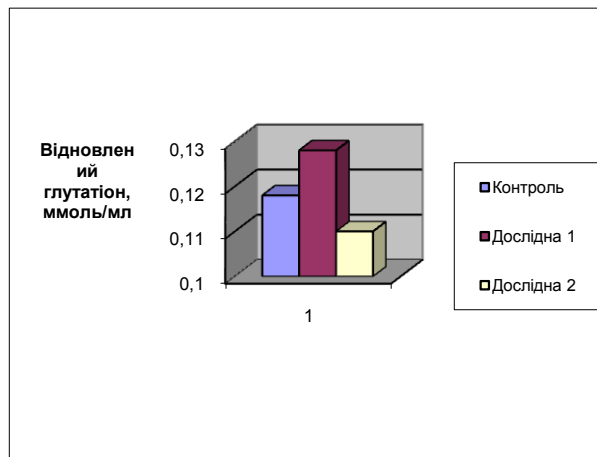


Рис.5. Кількість відновленого глутатіону у крові самок щурів на 9-й день після запліднення за умов введення препарату селену.

За кількістю відновленого глутатіону (рис. 5) ми прослідкували зміну активності ферменту глутатіонредуктази. З приведених даних очевидно, що найактивнішим цей фермент є у тварин також першої дослідної групи, причому в другій групі (введення препарату до і після запліднення) його рівень є навіть нижче за контрольних тварин, у яких, рівень антиоксидантних процесів знаходиться в межах норми.

Загалом, отримані нами результати свідчать про те, що застосування препарату селену до запліднення позитивно впливає як на активацію антиоксидантних процесів, та і на процеси імплантації і становлення вагітності у щурів. При цьому встановлено, що показники рівня ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) залишаються у межах фізіологічної норми у щурів, а отже є збережена нормальна функціональна активність таких важливих органів як печінка і серцевий м'яз. При токсичному впливі на печінку та при руйнуванні клітин печінки відмічаються підвищення фермента АЛТ у сироватці крові, а при

тяжкому ураженні печінки, на рівні органодів клітини, наприклад, при руйнуванні мітохондрій гепатитів, в крові різко зростає вміст фермента АСТ.

Висновки

1. Підшкірне трьохразове введення препарату селену щурам з депонуючою речовиною при стимуляції супероуляції за стандартною схемою з використанням ФСТ позитивно впливає на імплантаційні процеси, стимулюючи при цьому антиоксидантну систему організму в цілому шляхом підвищення активності ферментів глутатіонової антиоксидантної системи – глутатіонпероксидази, каталази і глутатіонредуктази.

2. Надлишкове введення препарату селену щурам після запліднення в досліджуваних дозах негативно впливає як на становлення ранньої вагітності, так і на активацію процесів антиоксидантного захисту.

Список літератури.

1. Bartle L. Influence of Injected Selenium in Dairy Bulls on Blood and Semen Selenium, Glutathione Peroxidase and Seminal Quality [Електронний ресурс] / Bartle L. Senger P. L., and J. K. Hillers. // Biology of Reproduction. - 1980. – Vol. 23. – P. 1007 - 1013. – Режим доступу до журн.:

http://www.biolreprod.org/cgi/search?sortspec=relevance&author1=&fulltext=Selenium%2Cglutathionperoxidas&pubdate_year=&volume=&firstpage=

2. Gardiner C. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo [Електронний ресурс] / Gardiner C. and Reed D. // Biology of Reproduction. – 1994. – Vol. 51. – P. 1307-1314. – Режим доступу до журн.:

<http://www.biolreprod.org/cgi/reprint/51/6/1307?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Gardiner&fulltext=CS+Gardiner+and+DJ+Reed&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resource=HWCIT>

3. Salmen James J. Role of Glutathione in Reproductive Tract Secretions on Mouse Preimplantation Embryo Development [Електронний ресурс] / Salmen James J., Frank Skufca, Ani Matt et al. // Biology of Reproduction. – 2005. – Vol. 73. P. 308 – 314. – Режим доступу до журн.:

<http://www.biolreprod.org/cgi/reprint/73/2/308?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Gardiner&fulltext=CS+Gardiner+and+DJ+Reed&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resource=HWCIT>

4. Catherine S. Gardiner. Glutathione Is Present in Reproductive Tract Secretions and Improves Development of Mouse Embryos after Chemically Induced Glutathione Depletion [Електронний ресурс] / Catherine S. Gardiner, James J. Salmen, Carolyn J. Brandt, and Shawn K. Stover. // Biology of Reproduction. – 1998. – Vol. 59. P. 431 - 436. – Режим доступу до журн.:

<http://www.biolreprod.org/cgi/reprint/59/2/431?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Gardiner&fulltext=CS+Gardiner+and+DJ+Reed&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resource=HWCIT>

5. Das S. Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? [Електронний ресурс] / Das S., Chattopadhyay R., Ghosh S. et al. // Human Reproduction. – 2006. Vol. 21. – P. 2403 - 2407. – Режим доступу до журн.:

<http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/reprint/21/9/2403?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=selenium%2Coxidative+stress%2Cpregnancy&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCIT>

6. Ruder E. H. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility [Електронний ресурс] / Ruder E. H., Hartman T. J., Blumberg J., and M. B. Goldman // Human Reproduction Update. – 2008. -dmn011.1. – Режим доступу до журн.:

<http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/dmn011v1>

7. Клапес Т. Selenium in placenta predicts birth weight in normal but not intrauterine growth restriction pregnancy.[Електронний ресурс] / Клапес Т., Cavar S., Kasac Z., Rucević S., Popinjac A. // Journal of trace elements in medicine and biology. – 2008. – 2007. – Vol.22. - №1. – P.54-58. – Режим доступу до журн.:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319141?dopt=Abstract>

Федорова С. В., Гевкан И. И. Активность ферментов антиоксидантного статуса и репродуктивная функция крыс при введении препарата селена.

В статье описано влияние селеносодержащего препарата на антиоксидантный статус организма крыс на ранних стадиях беременности. Показано позитивное влияние селена на процессы имплантации в условиях введения препарата до оплодотворения. Выявлено, что избыточное введение селена повторно после оплодотворения на ранних стадиях беременности влияет на имплантацию негативно. Аналогично репродуктивной функции, антиоксидантная защита организма активируется также при условии введения препарата до оплодотворения и имеет самый низкий уровень при избыточном поступлении селена.

Ключевые слова: антиоксидантная защита, селен, оплодотворение.

**Fyodorova S.V., Nevkan I.I. Activity of antioxidative protection enzymes
And reproductive function in rats at selenium treatment.**

In article is described a preparation with selenium on antioxidative status in rats at early stages of pregnancy. Positive influence of selenium on processes of implantation is shown in the conditions of injected a preparation before fertilisation. It is revealed that superfluous introduction of selenium repeatedly after fertilisation negatively influences on implantation at early stages of pregnancy. Similarly reproductive function, antioxidative protection is activated also under conditions of injected of a preparation before fertilisation and has the lowest level at superfluous receipt of selenium.

Keywords: antioxydative status, selenium, fertilisetion.