

ВЕТЕРИНАРІЯ, ТЕХНОЛОГІЇ ТВАРИНИЦТВА ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

VETERINARY SCIENCE, TECHNOLOGIES OF ANIMAL HUSBANDRY AND NATURE MANAGEMENT

ISSN 2617-8346 (Print)
ISSN 2663-5542 (Online)

doi: 10.31890/vttp.2019.04.18
<http://ojs.hdzva.edu.ua/>

UDC 636.92.09:616.64:542.943:577.115:577.34

Estimation of lipid peroxidation state by chemiluminescent method in male rabbits for gonadodystrophy

V. I. Koshevoy¹, S. V. Naumenko¹, N. S. Kavok²

¹Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

²Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine

Article info

Received 14.10.2019

Received in revised form

06.11.2019

Accepted

15.11.2019

¹Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine
Akademichna Str. 1, Mala Danylivka, Dergachi district, Kharkiv region, Ukraine, 62341
E-mail:

vsevolod_koshevoy@yahoo.com

²Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine,
60 Nauky Ave., Kharkiv, 61072

Koshevoy, V. I., Naumenko, S. V., & Kavok, N. S. (2019). Estimation of lipid peroxidation state by chemiluminescent method in male rabbits for gonadodystrophy. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 4, 90-94, doi: 10.31890/vttp.2019.04.18.

Reducing the reproductive capacity of males is one of the major problems in andrology. Poor quality of semen and its reproductive capacity, impaired structural and functional characteristics of sperm is a consequence of gonadodystrophy. The leading link in the pathogenesis of various types of gonadodystrophy is the violation of the prooxidant-antioxidant system. Early diagnosis of a complex of pathological processes that develop in gonadodystrophy is possible due to the registration of the intensity of the processes of free radical oxidation. It is known that a highly sensitive way of detecting subtle biochemical shifts is chemiluminescence, which is used to detect free radical oxidation, the development of generalized oxidative stress. The aim of the study was to estimate the state of lipid peroxidation in rabbits with gonadodystrophy by the chemiluminescent method. The main tasks of the study: to investigate the state of the lipid peroxidation system by determining the final product of peroxidation – malondialdehyde in the serum of rabbits with gonadodystrophy; to determine the intensity of rabbit serum chemiluminescence and to determine the use of this technique for the diagnosis of gonadodystrophy. Three groups were formed: control – clinically healthy animals kept on a standard diet; experimental group I – rabbits with alimentary type of gonadodystrophy (prolonged maintenance on a diet deficient in carotene (vitamin A), Zinc); experimental group II – rabbits with gonadodystrophy of toxic type (chronic nitrate-nitrite toxicosis, caused by feeding of sodium nitrate). Serum samples were taken in 15, 30, and 45 day of the study. The concentration of malondialdehyde was determined by a fluorimetry method based on the reaction between malondialdehyde and thiobarbituric acid, which occurs under conditions of high temperature and acidic environment, with the formation of a colored trimethin complex. Spectra of spontaneous chemiluminescence of serum samples were measured on a chemiluminometer "Lum-5773", manufactured by the Russian Federation, which was connected to an interface with a personal computer to record the instrument performance with PowerGraph software (version 3.3). The rate of light chemiluminescence was estimated in 5 minutes. The state of lipid peroxidation in rabbits according to the malondialdehyde content showed a significant increase in the indicator in the experimental groups I, II compared with the control. It was noted that in the animals of the experimental group I with gonadodystrophy of alimentary type there was increased number of malondialdehyde in the serum by 15 days (by 58,3 %, $P > 0.001$), the figure reached the maximum value by 45 days of the experiment (increase by 76 %, $P > 0.001$), however, there was a minimal difference between the 30 and 45 day samples. In serum samples of male rabbits with toxic gonadodystrophy, there was a marked increase in malondialdehyde concentration by the 15th day of the experiment (by 75 %, $P > 0.001$), and by an increase in the number during the experiment (up to 96 % by 45 days, $P > 0.001$). Data obtained from a chemiluminescent serum study had a similar upward trend as with malondialdehyde in both groups. This may indicate a lack of activity of the body antioxidant protection system and the need for antioxidant therapy, due to the complexity of the chemiluminescence indicator, which is a concomitant marker of free radical oxidation. Chemiluminescent analysis of serum samples of rabbit males showed high efficiency as a diagnostic tool for gonadodystrophy and showed similar results to the malondialdehyde determination. Obtained during chemiluminescent analysis, data indicate the need of

therapeutic measures as early as the 15th day of the experiment, due to the significant accumulation of lipid peroxidation products and the lack of adequate response of the organism to the action of external factors.

Keywords: male, rabbits, gonadodystrophy, chemiluminescence, blood serum, lipid peroxidation.

Оценка состояния перекисного окисления липидов методом хемилюминесценции у самцов кролей с гонадодистрофиями

В. И. Кошевой¹, С. В. Науменко¹, Н. С. Кавок²

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия, Харьков, Украина

²Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, Харьков, Украина

Целью работы было изучение в организме кролей с гонадодистрофиями состояния перекисного окисления липидов хемилюминесцентным методом. Задачи исследования: исследовать состояние перекисного окисления липидов путем определения конечного продукта перекисидации липидов – малонового диальдегида в сыворотке крови самцов кролей с гонадодистрофиями; определить показатель светосуммы хемилюминесценции сыворотки крови самцов кролей и выяснить возможность использования данной методики для диагностики гонадодистрофий. Было сформировано три группы: контрольная – клинически здоровые животные, содержавшиеся на стандартном рационе; опытная группа I – самцы кролей с гонадодистрофией алиментарного типа; опытная группа II – самцы кролей с гонадодистрофией токсического типа (при хроническом нитратно-нитритном токсикозе). Проводили отбор проб сыворотки крови на 15, 30 и 45 сутки эксперимента. Концентрацию малонового диальдегида определяли методом флуориметрии. Спектры спонтанной хемилюминесценции проб сыворотки крови измеряли на хемилюминометре «Lum-5773». Оценивали показатель светосуммы хемилюминесценции за 5 минут. Оценка состояния перекисного окисления липидов у самцов кролей выявила достоверное повышение показателя в опытных группах I, II в сравнении с контролем. Отмечено, что у животных опытной группы I при гонадодистрофии алиментарного типа произошло повышение количества малонового диальдегида уже на 15 сутки эксперимента (на 58,3 %, $P > 0,001$), достигнув максимального значения на 45 сутки (увеличение на 76 %, $P > 0,001$). В пробах сыворотки крови самцов с гонадодистрофией токсического типа (опытная группа II) отмечено значительное повышение содержания малонового диальдегида уже на 15 сутки (на 75 %, $P > 0,001$). Данные полученные при хемилюминесцентном исследовании проб сывороток крови самцов кролей имели аналогичную тенденцию к возрастанию, как и при определении малонового диальдегида в обеих группах. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о возможности применения хемилюминесцентного исследования для диагностики гонадодистрофий у самцов, как быстрый и достоверный метод.

Ключевые слова: самец, кроли, гонадодистрофия, хемилюминесценция, сыворотка крови, перекисное окисление липидов.

Оцінка стану перекисного окислення ліпідів методом хемілюмінесценції у самців кролів за гонадодистрофій

В. І. Кошевой¹, С. В. Науменко¹, Н. С. Кавок²

¹Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна

²Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, Харків, Україна

У самців кролів за гонадодистрофій виявлено інтенсифікацію процесів перекисного окислення ліпідів, що підтверджується підвищенням інтенсивності хемілюмінесценції сироватки крові і вмісту кінцевого продукту перекисидатії ліпідів – малонового діальдеїду.

Ключові слова: самець, кролі, гонадодистрофія, хемілюмінесценція, сироватка крові, перекисне окислення ліпідів.

Вступ

Актуальність проблеми. Зниження репродуктивної здатності самців є однією з основних проблем андрології (Aitken, & Clarkson, 1987; Agarwal et al., 2007). Низька якість сперми і її відтворювальної здатності, порушення структурно-функціональних характеристик сперміїв є наслідком гонадодистрофій. Провідною ланкою патогенезу різних типів гонадодистрофій є порушення у прооксидантно-антиоксидантній системі (Koshevoi et al., 2015). Рання діагностика комплексу патологічних процесів, що розвиваються при гонадодистрофії можлива завдяки реєстрації інтенсивності процесів вільнорадикального окислення. Відомо, що високочутливим способом виявлення тонких біохімічних зсувів є

біохемілюмінесценція (БХЛ), яку використовують для реєстрації ВРО, розвитку генералізованого оксидативного стресу, при чому автори відзначають, що різні параметри БХЛ найчастіше залежать від дози та часу шкідливого впливу патогенів (Egorova, 2000; Zhukov, Zaytseva, & Antyufeeva, 2005).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Дослідження виконані рядом авторів в останні роки насичені інформацією стосовно взаємозв'язку процесів перекисного окислення ліпідів і активності антиоксидантного захисту й показників якості і відтворювальної здатності сперми різних видів самців (Comhaire, El Garem, Mahmoud, Eertmans, & Schoonjans, 2005; Piomboni et al., 2008). Ступінь погіршення якості сперми та зниження запліднювальної здатності залежать від зростання вмісту ТБК-активних продуктів

та зниження активності ферментів АОЗ у сироватці крові та плазмі сперми (Sharma et al., 2010; Chornozub, 2013). Вивчення інтенсивності окисних процесів у спермі дає змогу встановити стійкість клітин до зовнішніх чинників, їх здатність до руйнування активних форм Оксигену та знищення цитотоксичних продуктів обміну (Shekarriz, Thomas, & Agarwal, 1995; Sharma, & Agarwal, 1996; Sharma, Pasqualotto, Nelson, Thomas, & Agarwal, 1999; Agarwal, Makker, & Sharma, 2008; Desai, Sharma, Makker, Sabanegh, & Agarwal, 2009; Agarwal, Mulgund, Sharma, & Sabanegh, 2014; Du Plessis, Agarwal, Halabi, & Tvrdá, 2015; Cocuzza et al., 2008; Yaremchuk, Kuzmina, Sharan, & Kava, 2017).

Мета роботи – вивчення в організмі кролів із гонадодистрофіями стану перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) хемілюмінесцентним методом.

Завдання дослідження:

1. Дослідити стан перекисного окислення ліпідів шляхом визначення кінцевого продукту пероксидації – малонового діальдегіду (МДА) у сироватці крові кролів із гонадодистрофіями.

2. Визначити інтенсивність хемілюмінесценції сироватки крові кролів і з'ясувати можливість використання даної методики для діагностики гонадодистрофій.

Матеріал і методи досліджень

Робота виконана в лабораторіях кафедри ветеринарної репродуктології ХДЗВА та Інституті синтіляційних матеріалів НАН України. Дослідження проведені на статевозрілих кролях (n=15), що належали НВЦ ХДЗВА. Було сформовано три групи: контрольна – клінічно здорові тварини, що утримувалися на

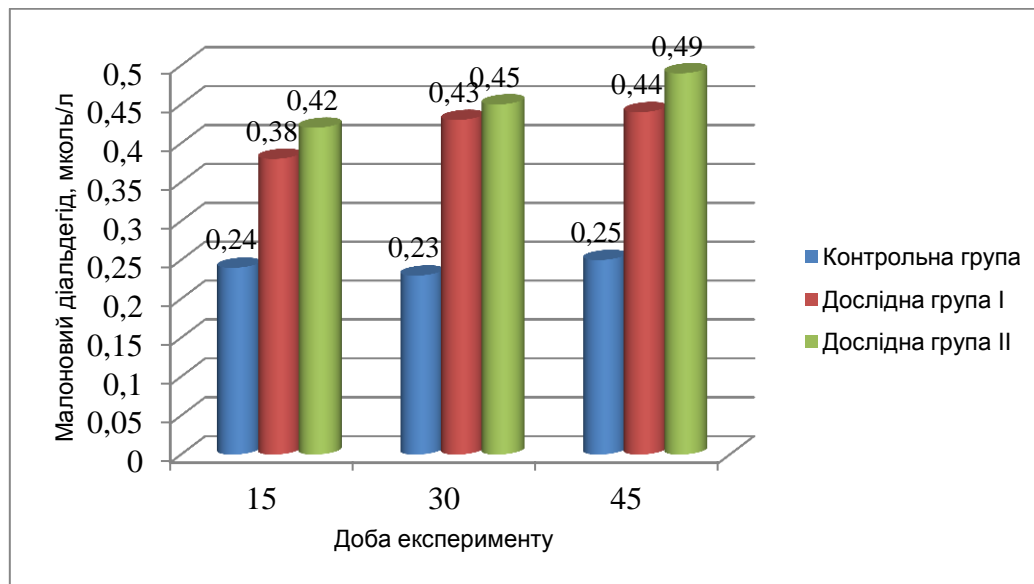
стандартному раціоні; дослідна група I – кролі із гонадодистрофією аліментарного типу (тривале утримання на раціоні дефіцитному за каротином (вітаміном А), Цинком); дослідна група II – кролі із гонадодистрофією токсичного типу (хронічний нітратно-нітритний токсикоз, викликали згодуюванням нітрату натрію). Проводили відбір проб сироватки крові на 15, 30 і 45 добу дослідження. Концентрацію МДА визначали у Центральній науково-дослідній лабораторії Національного фармацевтичного університету методом флуориметрії, що базується на реакції між МДА та тіобарбітуровою кислотою, яка відбувається за умов високої температури та кислого середовища з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм (Fedorova, Korshunova & Larskiy, 1983). Спектри спонтанної хемілюмінесценції проб сироватки крові вимірювали на хемілюмінометрі «Lum-5773» виробництва РФ, який був зв'язаний інтерфейсом з персональним комп'ютером для реєстрації показників приладу програмним забезпеченням PowerGraph (версія 3.3). Оцінювали показник світлосуми хемілюмінесценції (ХЛ) за 5 хвилин. Проводили статистичну обробку результатів за t-критерієм Ст'юдента (Rebrova, 2003).

Результати та їх обговорення

Стан перекисного окислення ліпідів у кролів за вмістом МДА виявив достовірне підвищення показника у дослідних групах I, II у порівнянні з контролем. Отримані дані наведено на діаграмі 1.

Діаграма 1

Концентрація малонового діальдегіду у сироватці крові кролів

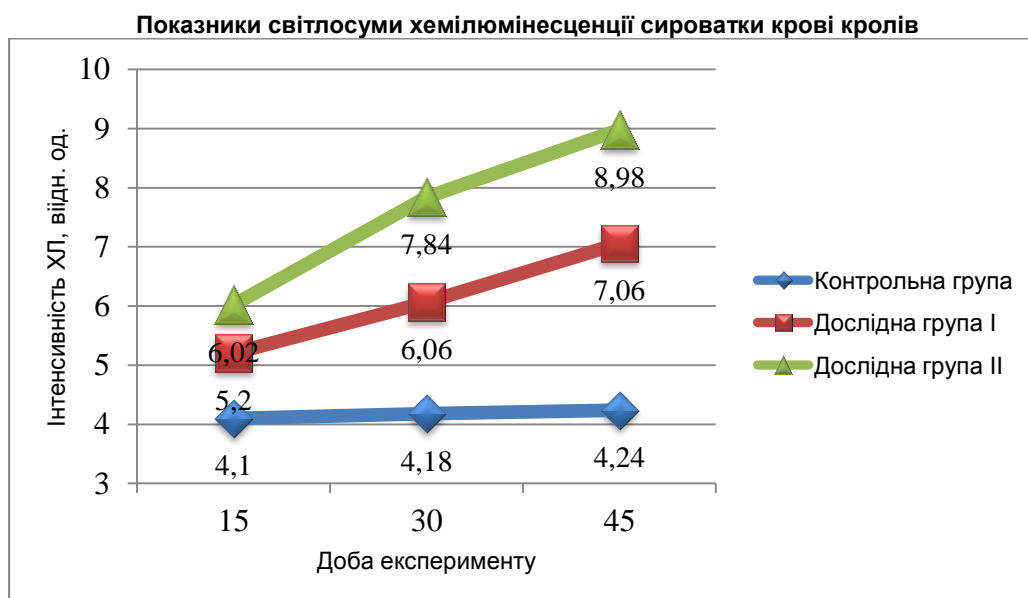


Відмічено, що у тварин дослідної групи I за гонадодистрофії аліментарного типу відбулося підвищення кількості МДА у сироватці крові на 15 добу (на 58,3 %, $P > 0,001$), показник сягнув максимального значення на 45 добі експерименту (збільшення на 76 %, $P > 0,001$), проте мала місце мінімальна відмінність між пробами на 30 і на 45 добу.

У пробах сироватки крові самців кролів із гонадодистрофією токсичного типу відзначено значне

підвищення концентрації МДА вже на 15 добу експерименту (на 75 %, $P > 0,001$), і наявність збільшення кількості на протязі експерименту (до 96 % на 45 добу, $P > 0,001$).

Наступним етапом було проведення вимірювання спектрів хемілюмінесценції. Отримані дані по світлосумі за 5 хвилин, оброблені арифметично, наведені на діаграмі 2.



Дані досліджень свідчили про статистично достовірне підвищення світлосуми спонтанної ХЛ сироватки крові усіх груп кролів порівняно з контролем. Вони мали аналогічну тенденцію до зростання, як і при визначенні МДА. Це може свідчити про недостатню активність системи антиоксидантного захисту організму й необхідність антиоксидантної терапії, через комплексність показнику ХЛ, який є одночасним маркером ВРО і дії АОЗ.

При цьому чітко простежується динаміка підвищення показника світлосуми спонтанної ХЛ у часі експерименту. Так, при гонадодистрофії аліментарного типу відбулося підвищення на 15 добу – на 26,8 %, на 30 добу – на 45 %, на 45 добу – на 66,5 %, $P > 0,001$ порівняно з контролем; а при гонадодистрофії токсичного типу: 15 добу – на 46,8 %, 30 добу – 87,6 %, 45 добу – 111,8 %, $P > 0,001$ порівняно з контролем. Такі результати чітко вказують на інтенсифікацію процесів ВРО, особливо в групі тварин з гонадодистрофією токсичного типу.

Тварини контрольної групи мали меншу світлосуму спонтанної ХЛ, що може свідчити про присутність незначної кількості АО у організмі, які перебувають у рівновазі.

Висновки

Отримані результати дозволяють зробити такі висновки:

1. Фактором розвитку гонадодистрофії у кролів є активація процесів ПОЛ, що підтверджується зростанням вмісту МДА і підвищенням світлосуми спонтанної ХЛ у сироватці крові, які досягають максимальних значень на 45 добу експерименту.
2. Отримані, під час хемілюмінесцентного аналізу, дані свідчать про необхідність проведення лікувальних заходів уже на 15 добу експерименту, через накопичення продуктів ПОЛ і відсутність адекватної відповіді організму на дію зовнішніх чинників.

Перспективи подальших досліджень. Показник хемілюмінесценції сироватки крові є досить інформативним й може використовуватися для діагностики гонадодистрофій у самців. Біохімічний моніторинг інтенсивності ХЛ дасть змогу оцінити ефективність терапії, превенції андрологічних захворювань.

References

- Agarwal, A., Deepinder, F., Cocuzza, M., Agarwal, R., Short, R. A., Sabanegh, E., & Marmar, J. L. (2007). Efficacy of varicocele surgery in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology*, 70 (3), 532–538. doi:10.1016/j.urology.2007.04.011.
- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 59 (1), 2–11. doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Sharma, R., & Sabanegh, E. (2014). Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 60 (4), 206–216. doi:10.3109/19396368.2014.918675.
- Aitken, R. J. & Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 81 (2), 459–469. doi:10.1530/jrf.0.0810459.
- Chornozub, T. V. (2013). Vplyv stanu antyoksydantnoi systemy na yakist spermy knuriv-plidnykiv ta yoho korektsiia, avtoreferat. *Sumskiy natsionalnyi ahramnyi universytet*, 18 p. [in Ukrainian].
- Cocuzza, M., Athayde, K.S., Agarwal, A., Pagani, R., Sikka, S. C., Lucon, A. M. ... Hallak, J. (2008). Impact of clinical varicocele and testis size on seminal reactive oxygen species levels in a fertile population: a prospective controlled study. *Fertil Steril.*, 90 (4), 1103–1108. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.1377.
- Comhaire, F. H., El Garem, Y., Mahmoud, A., Eertmans, F., & Schoonjans, F. (2005). Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J. Androl.*, 7 (3), 257–262. doi:10.1111/j.1745-7262.2005.00047.x.
- Desai, N., Sharma, R., Makker, K., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2009). Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertil Steril.*, 92 (5), 1626–1631. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.109.
- Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrdá, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 32 (4), 509–520. doi:10.1007/s10815-014-0425-7.

- Egorova, N. N. (2000). Otsenka toksichnosti i opasnosti atmosferykh zagryazneniy s pomoshch'yu lyuminescentnogo metoda. *Toksikologicheskiiy vestnik*, 1, 22–26 [in Russian].
- Fedorova, T. N., Korshunova, T. S., & Larskiy, E. G. (1983). Reaktsii s tiobarbiturovoy kislotoy dlya opredeleniya malonovogo dial'degida krovi metodom flyuorimetrii. *Laboratornoe delo*, 3, 25–28 [in Russian].
- Hammadeh, M. E., Radwan, M., Al-Hasani, S., Micu, R., Rosenbaum, P., Lorenz, M., & Schmidt, W. (2006). Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and non-pregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod. Biomed. Online*, 13 (5), 696–706. [doi:10.1016/S1472-6483\(10\)60661-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60661-X).
- Koshevoi, V. P., Naumenko, S. V., Koshevoi, V. I., Maliukin, Yu. V., Klochkov, V. K., & Kavok, N. S. (2015). Kompiuterniy monitorynh pokaznykiv strukturno-funktsionalnoho stanu orhaniv reproduktyvnoi systemy u samtsiv pry defitsyti karotynu (vitaminu A) ta tsynku, *Problemy zoonzhenerii ta veterynarnoi medytsyny*, 31 (2), 61-71 [in Ukrainian].
- Piomboni, P., Gambera, L., Serafini, F., Campanella, G., Morgante, G., & De Leo, V. (2008). Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J. Androl.*, 10 (2), 201–206. [doi:10.1111/j.1745-7262.2008.00356.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2008.00356.x).
- Rebrova, O. Yu. (2003). Statisticheskyy analiz meditsinskikh dannykh (primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA). *Moskva*, 312 p. [in Russian].
- Sharma, R. K. & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48 (6), 835–850. [doi:10.1016/S0090-4295\(96\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00313-5).
- Sharma, R. K., Pasqualotto, F. F., Nelson, D. R., Thomas, Jr A.J., & Agarwal, A. (1999). The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.*, 14 (11), 2801–2807. [doi:10.1093/humrep/14.11.2801](https://doi.org/10.1093/humrep/14.11.2801).
- Sharma, R. K., Sabanegh, E., Mahfouz R., Gupta, S., Thiyagarajan, A., & Agarwal, A. (2010). TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*, 76 (6), 1380–1386. [doi:10.1016/j.urology.2010.04.036](https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.04.036).
- Shekarriz, M., Thomas, Jr A. J., & Agarwal, A. (1995). Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology*, 45 (1), 103–107. [doi:10.1016/S0090-4295\(95\)97088-6](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(95)97088-6).
- Yaremchuk, I., Kuzmina, N., Sharan, M., & Kava, S. (2017). Oxidative processes intensity and quality of bull semen when adding microelements nanosuccinate compounds. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyi*, 19 (77), 185-189.
- Zhukov, V. I., Zaytseva, O. V., & Antyufeeva, O. I. (2005). Svyaz' parametrov dinamiki biokhemiyluminesentsii so stepen'yu kumulyatsii ksenobiotikov. *Eksperymental'naya i klinicheskaya meditsina*, 2, 51–55. [in Russian].