

DOI: 10.26693/jmbs03.02.227

УДК [612.08 + 616.81]- 092.9

Дмитренко Н. А.

БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ В СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ТРИВАЛІЙ ГІПОМЕЛАТОНІЕМІЇ

Полтавський національний педагогічний університет ім. В. Г. Короленка, Україна

nataliadmytrenko1@gmail.com

Активність супероксиддисмутази та каталази збільшилась, але активність супероксиддисмутази збільшилася майже вдвічі, ніж активність каталази. У зв'язку з тим, що супероксиддисмутаза є найбільшим продуцентом H_2O_2 у клітинах, то можна припустити деяке збільшення концентрації H_2O_2 як прооксидантного агента. Є літературні дані, що в сім'яниках провідними продуцентами супероксида-ніонрадикалу (вихідна активна форма кисню) є мітохондріальний та мікросомальний електронно-транспортні ланцюги окиснення, а дихальний вибух фагоцитів дає у 8–22 рази менше супероксиду, але при стресі, запаленні, гама-опроміненні, старінні проходить дисбаланс генерації активних форм кисню, збільшується частка від дихального вибуху, що вражає мембрану клітин та призводить до некрозів. Внутрішньоклітинні генератори діють і на ДНК, але тут можливим захисним механізмом є мелатонін як антиоксидант, а збільшення пероксидації може гальмувати поділ клітин та викликати мутагенні пошкодження ДНК (деметилування 5-метилцитозину, утворення 8-оксогуаніну).

Ключові слова: мелатонін, сім'яники, гіпомелатоніємія.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом комплексної теми «Вплив мелатоніну на функції систем організму», № держ. реєстрації 0106U002994.

Вступ. За останні сорок років збільшився інтерес до біологічної функції мелатоніну. Є дані, що мелатонін гальмує репродуктивні властивості жіночого організму, але мало відомостей про вплив мелатоніну на чоловічу статеву систему насамперед сім'яників [1, 3, 7].

Мелатонін – це гормон епіфізу, який продукується також і клітинами APUD-системи. В епіфізі

мелатонін синтезується в темряві, внаслідок чого виникають суттєві зміни концентрації мелатоніну в день та вночі, що зумовлює біологічні ритми організму. Як нейромедіатор мелатонін активує проведення нервових імпульсів та сприяє засинанню. Як гормон, мелатонін блокує мітози, гальмує секрецію гормонів гіпоталамусу та гіпофізу, що знижує функцію гонад. Мелатонін складається з мембранних та ядерних (впливають на експресію генів) рецепторів. Мелатонін активує імунну систему. Він є найважливішим ендogenous антиоксидантом, який прямо інактивує кисневі радикали або впливає на експресію антиоксидантних та прооксидантних ферментів. Загалом мелатонін як нейромедіатор, гормон, цитокін підвищує адаптацію організму до змін навколишнього середовища. Тобто мелатонін є адаптогеном, який гальмує старіння та канцерогенез. Із віком в епіфізі накопичується мозковий пісок та зменшується секреція мелатоніну [1, 2, 3, 6, 15, 18, 23, 26].

Чоловіча репродуктивна система складається з сім'яників, деяких різних додаткових залоз та допоміжного апарату. Сім'яники виробляють мейозом сперматозоїди та як ендокринний орган – чоловічий статевий гормон тестостерон. Вважається, що мелатонін гальмує в гіпоталамусі секрецію гонадотропінів, у гіпофізі – гонадотропінів, що зменшує продукцію тестостерону сім'яниками. У людини цикл сперматогенезу складає біля 74 ± 4 діб, у щурів – 48 ± 2 діб. Сперматогенез потребує в сім'яниках низького рівня неферментативного вільнорадикального перекисного окиснення за рахунок підвищеного рівня антиоксидантного захисту [4, 5, 6, 8, 13, 14].

Прооксидантно–антиоксидантна система складається з генерації активних форм кисню, які ініціюють неферментативне вільнорадикальне перекисне окиснення, що лімітується антиоксидантним захистом [9, 10, 11, 12, 19, 25].

Таблиця 1 – Біохімічні зміни в сім'яниках щурів при хронічній 55-денній гіпомелатоніемії

Показник	Інтактна група	Гіпомелатоніемія
МДА–0, мкмоль/кг	79,4±3,8	85,0±2,2
МДА–1,5, мкмоль/кг	123,1±2,6	141,0±4,2 p<0,01
Приріст МДА, %	55,2	65,9
СОД, Ум. од.	25,6±4,0	35,8±1,7 p<0,05
Каталаза, од.акт.	12,2±1,1	15,2±0,2 p<0,05

Примітка: За 100% взято значення МДА-0.

Праця людей у нічну зміну, спання при світлі, значне освітлення міст, полярні дні сприяють гіпомелатоніемії. В аптеках у вільному продажі є мелатонін як снодійне, яким користуються безконтрольно. Але в літературі немає відомостей про взаємозв'язок гіпомелатоніемії з прооксидантно-антиоксидантним станом сім'яників.

Мета роботи – дослідження біохімічних змін в сім'яниках щурів при хронічній тривалій гіпомелатоніемії.

Матеріал і методи дослідження. Для виконання поставлених завдань були проведені досліди *in vivo* на щурах-самцях лінії Wistar масою 180–190 г. Умовну норму склали 6 інтактних тварин. У другій дослідній групі з 6 щурів відтворювали гіпомелатоніемію: тварин терміном 55 діб, що порівнюється з терміном сперматогенезу в щурів (48 діб) витримували при цілодобовому освітленні, а в останню добу не давали спати. Еутаназію проводили під гексеналовим наркозом шляхом відбору крові зі шлуночка серця. Тварини утримувалися в умовах згідно зі "Стандартними правилами з упорядкування, устаткування та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". При роботі з лабораторними тваринами дотримувалися правил біоетики, морально-етичних норм, про що є висновок комісії (протокол № 31 від 26.09.2005 р.). Утримання щурів відповідало нормам типових віваріїв та ґрунтувалося на відповідних документах [2, 5, 17].

Таблиця 2 – Мітотичний індекс та патології мітозу у клітинах сім'яників при 55-денній гіпомелатоніемії

Показник	Інтактна група	Гіпомелатоніемія
Мітотичний індекс, кількість клітин в стані мітозів на 1000 клітин	11,60 ± 0,82	14,41 ± 0,79 p<0,05
Патології мітозів, %	14,20 ± 3,00	55,31 ± 0,67
Профаза, %	10,0 ± 2,0	29,0 ± 3,0
Патології профазы, %	12,0 ± 2,0	32,5 ± 4,0
Метафаза, %	21,0 ± 3,0	21,0 ± 2,0
Патології метафазы, %	7,1 ± 1,0	5,0 ± 1,0

Примітка: % до кількості мітотичних клітин в мітозі.

Визначали коефіцієнт маси сім'яників, концентрацію у них вторинних продуктів вільнорадикального перекисного окиснення біополімерів до (МДА–0) та після (насамперед малоновий діальдегід, МДА–1,5) півторагодинної інкубації гомогенату в прооксидантному залізо–аскорбінатному буферному розчині, активності супероксиддисмутази (СОД) та каталази. З додаткових залоз відбирали рідину для оцінки вмісту сперматозоїдів, їх життєздатність та кількість патологічних форм. Статистичну обробку цифрових результатів проводили за Ст'юdentом-Фішером.

Результати дослідження та їх обговорення.

При тривалій гіпомелатоніемії вихідний рівень вторинних продуктів пероксидації (МДА–0) та приріст МДА за час інкубації гомогенату сім'яників достовірно не відрізнялися від норми, але на 15% (p < 0,01) збільшився вміст МДА після інкубації, тобто антиоксидантний захист сім'яників недостатній (**табл. 1**). Але в сім'яниках збільшилася на 40% (p < 0,05) активність супероксиддисмутази та на 25% (p < 0,05) активність каталази. СОД є головним продуцентом у клітинах пероксиду водню – активній формі кисню, що руйнується каталазою. Внаслідок того, що ріст активності СОД випереджає на 15% ріст активності каталази, можна припустити, що це слабе місце антиоксидантного захисту, яке обумовило, за реакцією Габера–Вейса, підвищення концентрації МДА–1,5. Слід відмітити, що СОД і каталаза найактивніші з усіх ферментів [4, 15, 18, 27].

Слід відмітити, що відсутність у тварин всіх груп виразок шлунку та кишечника вказує на незначну роль стресу в наведених даних. Раніше показано, що в сім'яниках ведучими продуцентами супероксиданіонрадикалу (вихідна активна форма кисню) є мітохондріальний та мікосомальний електронно–транспортні ланцюги окиснення, а дихальний вибух фагоцитів дає в 8–22 рази менше супероксиду, але при стресі, запаленні, гамма-опроміненні, старінні відбувається дисбаланс генерації активних форм кисню, збільшується частка від дихального вибуху, що вражає мембрану клітин та призводить до некрозів. Внутрішньоклітинні генератори діють і на ДНК, але тут можливим захисним механізмом є мелатонін як антиоксидант [9, 12,13,20]. Збільшення пероксидації може гальмувати поділ клітин та викликати мутагенні пошкодження ДНК (деметилування 5–метилцитозину, утворення 8–оксогуаніну) [11,12,15].

Найбільш різноманітні морфологічні й гістологічні зміни в препаратах сім'яників спостерігали у тварин, які підлягали цілодобовому освітленню 55 днів.

Кліткові елементи у всіх полях зору мікроскопа на гістологічних препаратах мали поліморфну

будову, в окремих ділянках – видовженої форми. Ядра клітин були гіперхромні, а при великому збільшенні мікроскопа відмічалось крайове та маргинальне розташування гетерохроматину. Остання обставина вказувала на значну проліферативну активність клітинних елементів.

У всіх гістологічних препаратах відмічалась велика кількість клітин, які знаходяться у стані мітотичного ділення. Але зустрічалась велика кількість відхилень від нормального перебігу мітозу (табл. 2).

Серед патологій мітозу зустрічаються патології метафаз, 7,5% складали двогрупові, тригрупові метафазі з мостами, багатогрупові метафазі, більше 5,5% всіх клітин поділу знаходилися в стадії патологічних анафазі й телофазі (тригрупова анафаза з відставанням хромосом, пізня телофаза з мостами).

При більш детальному дослідженні морфологічних особливостей патологій мітозу в третій експериментальній групі ми спостерігали хроматидні розриви, ацентричні й точкові фрагменти, обмін хромосом.

Більш половини всіх клітин мали різні аномалії: розриви та обміни хромосом, багатоплюсні мітози, утворення анафазних і телофазних мостів. Найбільш часто зустрічалися грубі порушення структури хромосом, які спричиняли у клітин, що діляться, колхициноподібну дію (к-мітоз) у результаті порушення фібрилярного апарату ахроматичного веретена ділення клітин.

Крім вищеписаних змін клітин, що діляться, необхідно відмітити наступні гістологічні особливості будови сім'яників. Перш за все, звертало на себе увагу зменшення еластичних волокон у оболонці в той час, коли загальна кількість аргірофільних і колагенових волокон різко збільшується. Зміни в стромі стосуються перш за все судин, волокнистих структур і клітин.

Кількість колагенових і еластичних волокон у міжканальцевій стромі дещо збільшиться, стає більше й аргірофільних волокон. Строма в ділянках, де розміщуються звужені й склерозовані канальці з

Таблиця 3 – Функціональний стан сім'яників при 55-денній гіпомелатоніемії

Показник	Інтактна група	Гіпомелатоніемія
Коефіцієнт маси обох сім'яників, %	0,98±0,03	1,14±0,03 p<0,01
Кількість сперматозоїдів, x 10 ⁶	48,6±0,95	48,8±0,9
Нежиттєздатні форми сперматозоїдів, %	18,7±1,7	16,8±0,4
Нежиттєздатні форми сперматозоїдів, x 10 ⁶	9,04±0,55	8,15±0,04
Патологічні сперматозоїди, %	16,9±1,0	16,2±0,6
Патологічні сперматозоїди, x 10 ⁶	8,4±0,5	7,74±0,24

проявами інтратубулярного склерозу, фіброзується й гіалінізується.

Внутрішній діаметр канальців зменшується, але потовщується й гіалінізується базальна мембрана, а також зовнішня оболонка канальців. Форма клітин Сертолі також підлягає морфологічним змінам. Так, серед них переважають елементи не з кутовими, а з округлими набухлими ядрами або гіпертрофікованими, гарно контурованими ядерцями, які розміщені диффузно по поверхні ядра. У їх цитоплазмі зустрічаються суданофільні включення й великі гранули незрілого ліпофусцину, який розміщується переважно в перінуклеарному просторі [2, 27].

Крім прямої антиоксидантної дії мелатоніну та його опосередкованої дії через секрецію гонадотропінів, припускаємо вплив модифікацій рівня активностей інших органів на функціонування сім'яників (табл. 3).

Висновок. При хронічній гіпомелатоніемії (терміном 55 діб) виявилось, що антиоксидантний захист у сім'яниках недостатній, що впливає зі збільшення вмісту малонового діальдегіду після 1,5 год інкубації гомогенату сім'яників у прооксидантному залізо-аскорбатному буферному розчині.

Перспективи подальших досліджень. Потребує подальшого дослідження стан чоловічої репродуктивної системи при інших варіантах гіпомелатоніемії.

References

1. Anisimov VN. Fiziologicheskie funktsii epifiza. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im IM Sechenova*. 2000: 1-13. [Russian]
2. Bondarenko LA. Sovremennye predstavleniya o fiziologii epifiza. *Neypofiziologiya*. 1997; 3: 212-37. [Russian]
3. Bondarenko LA, Hevorkyan AR. Sutochnye ritmy vlyucheniya N-melatonina v orhany hipotalamo-hipofizarnotireoidnoy sistemy u krysa v opitakh in vitro. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2007; 143 (6): 693-5. [Russian]
4. Dmitrenko NA. Histologichni zmini honad pri eksperimentalniy khronichniy hipomelatoninemiyi. *Zbirnik naukovikh prats*. 2007. s 158-62. [Ukrainian]
5. Zapadnyuk II, Zapadnyuk VI, Zakhariya EA, Zapadnyuk BV. *Laboratornye zhivotnye*. K: Vishcha shkola, 1983. 382 s. [Russian]

6. Pishak VP, Bulik RYe. Dobovi zmini shchilnosti melatoninovikh retseptoriv 1A u neyronakh suprakhiyazmatichnikh yader hipotalamusa shchuriv za umov riznoi funktsionalnoi aktivnosti shishkopodibnoi zalozi. *Fiziol zhurnal*. 2008; 54 (4): 11-5. [Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/fz54.04.011>
7. Pochernyaeva V, Kovalenko V. Antioksidanty i reproduktivnaya funktsiya khryakov-proizvoditeley. *Zootekhnika*. 1997; 2: 27-9. [Russian]
8. Reznikov AH. Vzhlyad patofiziolooha-endokrinolooha na problemu vozzrastnoho defitsita androhenov u muzhchin (LOH-sindrom). *Mizhnarodnyi endokrinologichnyi zhurnal*. 2014; 62 (6): 11-8. [Russian]
9. Teppermen Dzh, Teppermen Kh. *Fizioloohiya obmena veshchestv i endokrinnoy sistemy*. M: Mir, 1989. 656 s. [Russian]
10. Tsebrzhinskiy OI. Oksidativna aktivnist u spermatozoidiv. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2000; 4: 75-7. [Ukrainian]
11. Tsebrzhinskiy OI. Problema osnov rehulyatsiy na riznikh rivnyakh zhivoho. *Visnik Kiyivskoho derzhavnoho universitetu im T Shevchenka. Fizioloohiya. Problemi rehulyatsiy fiziologichnikh funktsiy*. K: KHU, 2000; 6: 61-4. [Ukrainian]
12. Tsebrzhinskiy O.I. *Teoreticheskaya bioloohiya i filosofiya*. Poltava, 2008. 49 s. [Russian]
13. Tsebrzhinskiy OI. Rol izmeneniy antioksidantnoho statusa orhanizma i oksilitelnykh povrezhdeniy DNK v zhiznennom tsikle kletok. *Nauchnyi vestnik Tyumenskoho hosudarstvennoho universiteta*. 1999; 4: 56-62. [Russian]
14. Chazov EI, Isachenko VA. *Epifiz: mesto i rol v sisteme neyroendokrinnoy rehulyatsii*. M, 1974. 375 s. [Russian]
15. Frenkel YuD, Anasevich YaV, Hilmutdinova MSh, Zvarich KM, Zubrik DV, et al. Vznachennya kilkosti ta dzherel superoksidu v orhanakh shchuriv pri hipo- ta hipermelatoninemiyakh. *X Mizhnarodni novorichni chitannya: zb nauk prats*. Mikolaiv, 2010; 10: 137-41. [Ukrainian]
16. Frenkel YuD, Pshichenko VV, Tsebrzhinskiy OI. Morfofunktsionalna orhanizatsiya klitin shishkopodibnoi zalozi za yikh morfometriyeyu. *Aktualni problemi suchasnoi bioloohiyi ta zdorov'ya lyudini: XI mizhnar nauk konf: zb nauk prats*. Mikolaiv : MNU im VO Sukhomlinskoho, 2011; 11: 219-23. [Ukrainian]
17. Frenkel YuD, Semenчук SV, Laricheva EN, Tsvyakh OA, et al. Vliyanie izbytko melatonina na sostoyanie prooksidantno-antioksidantnoy sistemy. *Visnik stomatoloohiyi*. 2010; 5 (73): 40. [Russian]
18. Frenkel YuD, Chebotar LD, Antonova EI, Anasevich YaV, Hilmutdinova MSh, et al. Vliyanie izbytko melatonina na prooksidantno-antioksidantnyi status orhanov. *Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, Antioxidants and Human Health: 8-th National Scientific Practical Conference with International Participation: abstracts, Smolensk, Russia, 25-29 May 2014*. Smolensk, 2014. s 220-2. [Russian]
19. Shatalin BO, Kostenko VO. Pokazniki funktsionalnoho stanu spermi bilikh shchuriv za umov sukupnoi diyi na orhanizm nitratu natriyu ta renthenivskoho oprominennya. *Aktualni problemi suchasnoi meditsini: Visn Ukrainskoi med stomatol akademiyi*. 2016; 16 (3): 192-5. [Ukrainian]
20. Shostya AM, Kovalenko VF, Usenko SO, ta in. Rol aktivnikh form kisnyu v rehulyatsiyi spermatohenezu ta zaplidnenni u ssavtsiv. *Svinarstvo. Mizhvidomchiy temachniy naukoviy zbirnik*. Poltava: Tekhnoservis, 2007. s 66-75. [Ukrainian]
21. Basaria S. Reproductive aging in men. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013; 42 (2): 255-70. PMID: 23702400. DOI: 10.1016/j.ecl.2013.02.012
22. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2013. *European Journal of Cancer*. 2013; 49 (6): 1374-403. PMID: 23485231. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.027
23. Pye SR, Huhtaniemi IT, Finn JD, Lee DM, O'Neill TW, Tajar A, Bartfai G, et al. Late-onset hypogonadism and mortality in aging men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99 (4): 1357-66. PMID: 24423283. DOI: 10.1210/jc.2013-2052
24. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci*. 2000; 15: 246-50. PMID: 11390919. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.5.246>
25. Reznikov AG. The point of view of pathophysiological endocrinologist on the problem of age-related androgen deficiency in men (LOH-syndrome). *Mizhnarodnyi endokrinologichnyi zhurnal*. 2014; 62 (6): 11-8.
26. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013. *Cancer Journal for Clinicians*. 2013; 63 (1): 11-30. PMID: 23335087. DOI: 10.3322/caac.21166
27. Yassin DJ, Doros G, Hammerer PG, Yassin AA. Long-term testosterone treatment in elderly men with hypogonadism and erectile dysfunction reduces obesity parameters and improves metabolic syndrome and health-related quality of life. *J Sex Med*. 2014; 11: 1567-76. PMID: 24712761. DOI: 10.1111/jsm.12523

УДК [612.08 + 616.81]- 092.9

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОМЕЛАТОНИЕМИИ

Дмитренко Н. А.

Резюме. Активность супероксиддисмутазы и каталазы увеличилась, но активность супероксиддисмутазы увеличилась почти вдвое, чем активность каталазы. В связи с тем, что супероксиддисмутазы является самым большим продуцентом H₂O₂ в клетках, то можно допустить некоторое увеличение концентрации H₂O₂ как прооксидантного агента.

Есть литературные данные, что в семенниках проводящими продуцентами супероксидами ион радикала (исходная активная форма кислорода) являются митохондриальная и микросомальная электронно-транспортная цепь окисления, а дышащий взрыв фагоцитов дает в 8–22 раза меньше супероксида. Но при стрессе, воспалении, гамма-облучении, старении проходит дисбаланс генерации активных форм кислорода, увеличивается часть от дыхательного взрыва, который поражает мембрану клеток и приводит к некрозам. Внутриклеточные генераторы действуют и на ДНК, но тут возможным защитным механизмом является мелатонин как антиоксидант, а увеличение пероксидации может тормозить деление клеток и вызывать мутагенные повреждения ДНК.

Ключевые слова: мелатонин, семенники, гипомелатонинемия.

UDC [612.08 + 616.81]- 092.9

Biochemical Changes in the Rats' Testicles in the Chronic Long-term Hypomelatoninemia

Dmytrenko N. A.

Abstract. The activity of superoxide dismutase and catalase was increased, but the activity of superoxide dismutase was increased almost 2 times than the activity of catalase.

The purpose of the work was to study biochemical changes in the testicles of rats in chronic long-term hypomelatoninemia.

Material and methods of research. To perform the tasks, we conducted experiments in vivo on male rats of the Wistar line weighing 180–190 g. The standard norm was 6 intact animals. In the second experimental group, 6 rats reproduced hypomelatoninemia: animals of 55 days, compared with the term spermatogenesis in rats (48 days), were kept at round-the-clock light, and on the last day they were not allowed to sleep. Euthanasia was performed under hexenal anesthesia by selecting blood from the ventricle of the heart. Animals were kept in conditions fixed in the "Standard Rules for Organizing, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (vivarium)". When working with laboratory animals, they adhered to the rules of bioethics, moral and ethical norms described in the conclusion of the commissions (Minutes № 31, September 26, 2005). The retention of rats was consistent with the standards of typical vivarium and was based on relevant documents.

Results and discussion. Due to the fact that superoxide dismutase is the major producer of H_2O_2 in the cells, we supposed some increasing in the concentration of H_2O_2 as prooxidant agent. Some researchers say that there is mitochondrial and microsomal electron-transport chain oxidation and respiratory burst of phagocytes in the testicles of the leading producers of the superoxide anion radical (output active form of oxygen). This reaction gives 8-22 times less superoxide.

Conclusions. The influence of stress, inflammation, gamma irradiation, aging cause the imbalance in generating reactive oxygen species, increases the proportion of the respiratory burst damaging the cell membrane, and leads to necrosis. Intracellular generators influence on the DNA, but here comes a possible protective mechanism of melatonin as an antioxidant. At the same time, increasing of peroxidation may inhibit cell division and cause mutagenic DNA damage (demethylation of 5-methylcytosine, forming of 8-oxoguanine).

Keywords: melatonin, testicles, hypomelatoninemia.

Стаття надійшла 08.01.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування