

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У КРЫС В ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

УДК 577.158:611—013.12—092

Поступила 1.07.2010 г.



О.Н. Шевантаева, к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии;
К.Н. Конторщикова, д.б.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФПКВ;
Ю.И. Косюга, к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — изучить состояние сперматогенеза и механизм его нарушений в раннем постреанимационном периоде.

Материалы и методы. Работа выполнена на 52 самцах белых беспородных крыс массой 230—290 г. Терминальное состояние воспроизвели путем моделирования острой гипобарической гипоксии. Проводилось цитологическое исследование клеточного состава семенников, оценивалась активность окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов.

Результаты. Выявлено снижение количества всех типов клеток в ткани семенников. Установлено, что ведущим патогенетическим фактором постреанимационных повреждений клеток семенников у крыс является чрезмерная активация процессов липопероксидации и окислительной модификации белков.

Ключевые слова: окислительный стресс, сперматогенез, постреанимационный период.

English

The role of oxidative stress in the pathogenesis of spermatogenesis disorders in rats in post-resuscitation period

O.N. Shevantaeva, PhD, Associate Professor, the Department of Pathological Physiology;
K.N. Kontorstchikova, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, the Faculty of Doctors' Advanced Training;
Y.I. Kosyuga, PhD, Associate Professor, the Department of Pathological Physiology

Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

The aim of the work is to study the condition of spermatogenesis and the mechanism of its disorders in an early post-resuscitation period.

Materials and methods. The study has been carried out on 52 white male non-pedigree rats, weighing 230—290 g. The terminal state was simulated by modeling acute hypobaric anoxia. There has been performed cytological examination of spermatocytes cells and assessed the activity of oxidative modification of proteins and lipid peroxidation.

Results. The reduction of the number of all types of cells in spermatid tissue was revealed. The leading pathogenic factor of post-resuscitation spermatid cell damages in rats was stated to be excessive enhancement of lipid peroxidation processes and proteins oxidative modification.

Key words: oxidative stress, spermatogenesis, post-resuscitation period.

Последние два десятилетия ознаменовались интенсивными исследованиями в области экспериментальной и клинической реаниматологии [1]. Значительное число работ посвящено изучению механизмов постреанимационной патологии. Реанимационное вмешательство, прервав умирание, не только обеспечивает восстановление функций организма, но и запускает ряд новых патологических процессов, которые могут оказаться причиной гибели оживленного организма. Реоксигенация и рециркуляция, ликвидируя последствия первичного патогенного воздействия, запускают

каскад новых патологических изменений [2]. Вопросы постреанимационной патологии жизненно важных органов достаточно полно отражены в экспериментальных и клинических исследованиях [1, 3—7], в то время как работ, посвященных изучению мужской репродуктивной системы в постреанимационном периоде, крайне мало [8—10].

Цель исследования — изучить состояние сперматогенеза и механизм его нарушений в раннем постреанимационном периоде.

Материалы и методы. Работа выполнена на 52 по-

Для контактов: Шевантаева Ольга Николаевна, тел. раб. 8(831)465-54-86, тел. моб. +7 906-357-03-45; e-mail: shevantaeva@list.ru.

ловозрелых самцах белых беспородных крыс массой 230—290 г. Терминальное состояние воспроизводили путем моделирования острой гипобарической гипоксии в проточной барокамере. Крыс «поднимали» на высоту 11,5—12,0 км и удерживали «на смертельной площадке» до появления агонального дыхания.

Для оценки состояния сперматогенеза использовали количественный цитологический метод [11], который заключается в приготовлении мазков из клеточной суспензии ткани семенников и окрашивании их по Романовскому—Гимзе. Абсолютное количество клеток сперматогенного эпителия в 1 г тестикулярной ткани вычисляли путем математических пропорций, используя абсолютное число сперматозоидов, подсчет которых проводился в камере Горяева.

Состояние прооксидантной системы оценивали по следующим показателям. Активность свободно-радикальных реакций в ткани тестикул определяли методом индуцированной хемилюминесценции [12] на приборе БХЛ-06. Информационными показателями считали I_{max} — максимальную интенсивность свечения исследуемой пробы, измеряемую в мВ, отражающую свободно-радикальную активность образца, и S — светосумму хемилюминесценции за определенное время (30 с), которая показывает общую активность антиоксидантных систем защиты. Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновых и триеновых конъюгатов (ДК и ТК) и конечных — оснований Шиффа (ОШ) оценивали спектроскопически по методу Волчегорского [13].

Окислительную модификацию белков (ОМБ) изучали по уровню карбонильных производных, выявляемых в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [14].

Полученные данные были обработаны с использованием U -критерия Манна—Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для анализа взаимосвязи двух признаков использовали корреляционный анализ по Спирмену. О характере связи судили по знаку и абсолютной величине коэффициента корреляции.

Результаты и обсуждение. После извлечения животных из барокамеры и оказания реанимационного пособия у крыс через 3—10 мин восстанавливался мышечный тонус и животные принимали обычную позу. Через 7—15 мин у них наблюдалось появление ориентировочных реакций. В течение последующих 30 мин у крыс восстанавливалась обычная форма поведения и пищевая активность.

Клеточный состав семенников оценивали на протяжении 3 сут эксперимента. На 40-й минуте постреанимационного периода мы не обнаружили достоверных количественных изменений всех типов клеток тестикул (табл. 1). Через сутки после моделирования терминального состояния наблюдалось снижение количества ранних и поздних сперматид. Количество спермато-

Таблица 1

Клеточный состав ткани семенника в раннем постреанимационном периоде, млн/1000 мг ($M \pm m$)

Исследуемые показатели	Сроки наблюдения			
	Интakтные животные (n=10)	40 мин (n=10)	1-е сутки (n=10)	3-и сутки (n=10)
Сперматогонии	27,8±1,1	26,0±1,4	25,8±1,3	2,3±0,1*
Сперматоциты	132,2±7,5	124,0±4,8	260,7±10,0*	8,9±0,4*
Сперматиды ранние	142,3±6,2	131,9±5,0	51,2±1,9*	1,1±0,1*
Сперматиды поздние	147,9±5,5	141,6±3,2	73,7±1,9*	5,4±0,2*
Сперматозоиды	81,0±1,6	79,5±1,2	78,5±1,8	32,0±1,7*
Клетки Сертоли	42,4±1,8	42,4±2,8	41,3±2,3	6,1±0,2*
Клетки Лейдига	8,1±0,9	7,7±0,9	8,0±0,8	0,6±0,1*

* — статистически значимые различия с интактными животными, $p < 0,001$.

ний, сперматозоидов, а также клеток Лейдига и Сертоли в ткани тестикул достоверно не отличалось от их уровня у интактных животных, а количество сперматоцитов выросло. На 3-и сутки эксперимента отмечалось значительное уменьшение количества всех типов клеток семенников.

Наиболее важной особенностью терминальных состояний является развитие той или иной формы гипоксии, которая в процессе умирания приобретает характер смешанной с преобладанием циркуляторных нарушений [5]. В клетках происходят блокада дыхательной цепи, накопление восстановленных переносчиков, распад АТФ, что в реанимационном периоде способствует усилению продукции активных форм кислорода и развитию окислительного стресса [1, 5]. Об этом свидетельствует двукратное увеличение на 40-й минуте постреанимационного периода показателя I_{max} , достигающего максимально высоких значений через сутки после оживления (табл. 2). Этот показатель отражает свободно-радикальную активность в ткани семенников. При этом показатель S , начиная с 40-й минуты постгипоксического периода и до 3-х суток, был высоким, что свидетельствует о низкой активности антиоксидантной системы в ткани семенников. Как известно, усиление образования свободных радикалов способствует повреждению белков и липидов мембран клеток [1, 15].

Таблица 2

Активность свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде ($M \pm m$)

Сроки наблюдения	I_{max} , мВ	S , отн. ед.
Интakтные животные (n=10)	1,73±0,06	16,76±0,58
40 мин (n=10)	2,85±0,08*	22,30±0,83*
1-е сутки (n=10)	3,36±0,05*	35,96±0,71*
3-и сутки (n=10)	2,92±0,07*	41,14±0,51*

* — статистически значимые различия с интактными животными, $p < 0,05$.

Таблица 3

Изменение уровня окислительной модификации белков в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде (M±m)

Сроки наблюдения	Длина волн, нм				
	356	363	370	430	530
Интактные животные (n=4)	6,58±1,09	6,70±1,03	6,79±0,98	3,59±0,44	0,50±0,03
40 мин (n=5)	10,60±0,50*	11,01±0,49*	11,19±0,48*	6,26±0,35*	0,76±0,07*
1-е сутки (n=4)	17,32±1,96*	17,87±2,04*	18,05±2,05*	10,59±1,23*	1,34±0,15*
3-и сутки (n=4)	5,58±1,21	5,94±1,22	6,17±1,22	3,19±0,73	0,43±0,16

* — статистически значимые различия с интактными животными, p<0,05.

Таблица 4

Количество продуктов перекисного окисления липидов в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде (M±m)

Сроки наблюдения	ДК, ед.опт.пл./г ткани	ТК, ед.опт.пл./г ткани	ОШ, ед.опт.пл./г ткани
Интактные животные (n=4)	0,140±0,003	0,050±0,002	2,56±0,67
40 мин (n=5)	0,190±0,004*	0,09±0,01*	13,16±0,73*
1-е сутки (n=4)	1,21±0,25*	0,24±0,04*	24,85 ±1,56*
3-и сутки (n=4)	0,41±0,07*	0,20±0,04*	13,99±2,45*

* — статистически значимые различия с интактными животными, p<0,05.

Таблица 5

Корреляционная связь между уровнем ОМБ и уровнем продуктов ПОЛ в ткани семенников в раннем постреанимационном периоде

Продукты ПОЛ	Длина волн, нм				
	356	363	370	430	530
ДК	r=0,890 p=0,00055	r=0,890 p=0,00055	r=0,890 p=0,00055	r=0,908 p=0,000274	r=0,841 p=0,000274
ТК	r=0,794 p=0,00610	r=0,794 p=0,00610	r=0,794 p=0,00610	r=0,782 p=0,007547	r=0,709 p=0,021666
ОШ	r=0,830 p=0,00294	r=0,830 p=0,002940	r=0,830 p=0,00294	r=0,794 p=0,006100	r=0,733 p=0,015801

Считают, что окислительная модификация белков играет ключевую роль в молекулярных механизмах окислительного стресса и является пусковым механизмом к окислительной деструкции других молекул (липиды, ДНК) клетки [15]. В результате реакций окисления белков могут образовываться альдегидные и кетонные группировки аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с 2,4-динитрофенилгидразином. Алифатические альдегид- и кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера определяются на длинах волн 356, 363, 370 нм, а основного характера — 430 и 530 нм.

При оценке ОМБ в ткани семенников в постреанимационном периоде установлено, что через 40 мин после оживления животных на всех длинах волн регистрируется достоверное увеличение карбонильных производных белков (табл. 3). На 1-е сутки эксперимента

количество модифицированных белков на всех длинах волн было в 2,6 раза выше, чем у интактных животных. На 3-и сутки изучаемые показатели ОМБ достоверно не отличались от таковых у интактных животных. Вероятно, это связано с тем, что модифицированные белки более чувствительны к протеолизу и удаляются с помощью протеасом и протеаз [16].

Кроме изменений активности ОМБ была изучена также динамика процессов липопероксидации в ткани семенников. Выявлено, что в течение первых двух суток постреанимационного периода на фоне повышения уровня образования активных форм кислорода и повышенного расхода антиоксидантов в ткани тестикул отмечается статистически достоверное увеличение содержания как начальных (ДК и ТК), так и конечных (ОШ) продуктов ПОЛ (табл. 4). Основания Шиффа, а также модифицированные белки, максимально накапливающиеся в ткани тестикул через сутки после реанимации, способствуют дестабилизации и деструкции мембраны клеток [15], о чем свидетельствует значительное снижение количества всех клеток сперматогенного эпителия, клеток Сертоли и Лейдига на 3-и сутки эксперимента. Вероятно, поэтому к 3-м суткам постреанимационного периода намечается тенденция к уменьшению содержания ОШ в ткани семенников. Тесная взаимосвязь

между процессами ПОЛ и ОМБ доказана статистически высоким уровнем их корреляции (табл. 5).

Заключение. Ведущим патогенетическим фактором постреанимационных повреждений клеток семенников является чрезмерная активация процессов липопероксидации и окислительной модификации белков. Очевидно, что воздействие на ключевые звенья патогенеза препаратами направленного действия позволит уменьшить степень повреждения, однако это требует дальнейших экспериментальных исследований.

Литература

1. Долгих В.Т., Русаков В.В., Кочетов А.М. и др. Нарушение метаболизма мозга при острой смертельной кровопотере. Нейронауки: теоретические и клинические аспекты 2008; 4(1): 52—56.

2. *Неговский В.А., Гурвич А.М., Золотокрылкина Е.С.* Пост-реанимационная болезнь. М: Медицина; 1987; 487 с.
3. *Андреева Н.Н., Мухина И.В., Соловьева Т.И.* Влияние мексидола на состав липидов и ПОЛ миокарда в пост-реанимационном периоде. *Общая реаниматология* 2005; 2: 26—30.
4. *Аврущенко М.Ш., Острова И.В., Волков А.В. и др.* Пост-реанимационные изменения морфофункционального состояния нервных клеток: значение в патогенезе энцефалопатий. *Общая реаниматология* 2006; 2(5—6): 85—96.
5. *Неговский В.А., Мороз В.В.* Теоретические и клинические проблемы реаниматологии. *Анест и реаниматол* 2000; 6: 4—22.
6. *White B.C., Sullivan J.M., De Gracia D.J. et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000; 179(1—2): 1—33.
7. *Евтушенко А.Я., Разумов А.С., Измestьев В.А. и др.* Биохимические и неврологические аспекты постреанимационной реперфузии. *Арх клин и эксперим мед* 2002; 2(1): 119—123.
8. *Апсалямев В.Х., Бажанов А.Н., Савенко В.А.* Морфофункциональное состояние эпителио-сперматогенного слоя канальцев семенника у крыс в постреанимационном периоде. *Морфология* 1993; 11—12: 106—113.
9. *Mizushima H., Nakamura Y., Matsumoto H. et al.* The effect of cardiac arrest on the blood-testis barrier to albumin, tumor necrosis factor-alpha, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, sucrose and verapamil in the mouse. *J Androl* 2001; 22(2): 255—260.
10. *Lysenko A.I., Kirpatovskii I.D., Glushakov A.S. et al.* Ultrastructural and enzyme chemical changes in dog testicles as affected by temporary interruption of blood circulation and use of cardiac. *Endocrinology* 2003; 144(7): 2882.
11. *Иванов Ю.В.* Цитологические критерии состояния сперматогенеза в токсико-гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария* 1986; 4: 52—55.
12. *Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К.* Применение индуцированной хемиллюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. В кн.: *Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов.* Горький 1983; с. 179—183.
13. *Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. и др.* Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии* 1989, 1: 127—131.
14. *Дубинина Е.Е. и др.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения. *Вопр мед химии* 1995; 41(1): 24—26.
15. *Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Павлов С.В. и др.* Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы). *Совр пробл токсикол* 2005; 3: 20—26.
16. *Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А.* Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. *Фундаментальные исследования* 2010; 1: 74—78.