

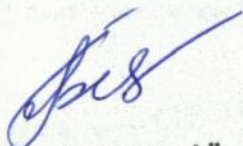
КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

БІДНА Лариса Павлівна

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЧОЛОВІЧИХ
ГАМЕТ МИШЕЙ В УМОВАХ ГАМА-ОПРОМІНЕННЯ
В ШИРОКОМУ ДІАПАЗОНІ ДОЗ ТА ДІЇ
АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛУ

03.00.11 - ембріологія, гістологія і
цитологія



Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1996



Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі фізіології і ембріології Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця

Наукові керівники: лауреат Державної премії України доктор медичних наук, професор КОЛОМІЙЦЕВ Андрій Костянтинович доктор біологічних наук АНДРЕЙЧЕНКО Сергій Вадимович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор МАЛЮК Віктор Іванович доктор біологічних наук, професор ВОЙЦИЦЬКИЙ Володимир Михайлович

Провідна організація: Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України

Захист дисертації відбудеться "17" вересня 1996 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.01.13 при Київському університеті імені Тараса Шевченка за адресою: 252022, Київ-22, пр. Глушкова, 2. НДІ фізіології Київського університету імені Тараса Шевченка, кім.504. Відгуки на автореферат надсилати за адресою: 252033, Київ-33, вул. Володимирська, 64.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського Університету імені Тараса Шевченка.

Автореферат розісланий "9" серпня 1996 року.

Вчений секретар спеціалізованої
Вченої ради доктор біологічних
наук, професор

ЛЯЩЕНКО П. С.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Виявлення закономірностей впливу на чоловічі статеві клітини іонізуючого опромінення представляє як біологічний, так і медичний інтерес.

Медичні аспекти цієї проблеми тісно пов'язані з вирішенням проблеми чоловічої неплодності і полягають в установленні механізмів альтеруючої дії іонізуючої радіації на клітини сперматогенного ряду, яка може привести не тільки до тимчасової, але і до спадкової патології у потомства, а також пошуку ефективних засобів захисту гамет від радіоушкодження. Особливої актуальності набуває ця проблема у зв'язку з екологічною обстановкою, яка склалася в Україні після аварії на Чорнобильській АЕС.

Тісно пов'язаний з медичним біологічний аспект проблеми визначається можливістю вибіркового впливу іонізуючої радіації на ядерний апарат чоловічих гамет, що є одним з найбільш перспективних шляхів з'ясування значення чоловічого геному в реалізації процесів клітинного диференціювання в ембріогенезі та пошуку нових шляхів регуляції початковими стадіями онтогенезу (Beatty R.A., 1964; Bedford J.M. et al., 1972; Смирнова И.Б. и др. 1977; Surani M.A. et al., 1984; Warner P. et al., 1991; Dool R., 1994).

Не дивлячись на значну кількість досліджень, в яких установлені деякі сторони впливу іонізуючого опромінення на клітини сперматогенного ряду в експерименті (Pinon-Lataillade G., 1985; Померанцева М.Д. и др., 1990) і в клініці, зокрема у осіб, які брали участь в ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС (Bansal M.R. et al., 1990; Стусь В.П., 1992; Кульбах О.С. и др., 1992; Нефедов Н.Ю. и др., 1992; Люлько А.А. и др., 1995), ряд питань цитопатології радіоуразених зрілих чоловічих гамет залишаються виясненими недостатньо. До них відносяться: стан мембранного апарату чоловічих гамет після радіоопромінення (в широкому діапазоні доз при різних потужностях доз), ультраструктура в цих умовах апарату руху сперміїв, взаємовідношення між ступенем пошкоджуючого впливу на ці клітини радіоопромінення і їх функціональним станом (рухливістю), та активністю деяких ключових ферментів біологічного окислення. До числа маловивчених питань відноситься також визначення у розвитку патологічних змін сперматозоїдів, викликаних опроміненням, ролі перекисного окислення ліпідів мембран і можливості захисного впливу в цих умовах екзогенного антиоксиданту.

Інститут Стефанія
України

МЕТА І ГОЛОВНІ ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ. Метою даного експериментально-морфологічного дослідження є вивчення особливостей морфофункціонального стану чоловічих гамет при радіоопроміненні в широкому діапазоні доз і встановлення характеру протекторного впливу на опроміненні спермії екзогенних антиоксидантів. Досягнення поставленої мети базувалося на вирішенні наступних завдань:

- встановити особливості мікро- та ультраструктурних змін сперматозоїдів та активності в них окисних ферментів (сукцинатдегідрогенази, лактатдегідрогенази) в умовах гама-опромінення в широкому діапазоні доз (3-3000 Гр);

- в'яснити залежність між структурними змінами сперматозоїдів, викликаних гама-опроміненням, життєздатністю і характером їх рухливості;

- визначити стан перекисного окислення ліпідів при альтеративних змінах сперміїв, викликаних гама-опроміненням;

- виявити вплив альфа-токоферолу на показники перекисного окислення ліпідів, цитохімію сукцинатдегідрогенази, лактатдегідрогенази та резистентність різних структурних компонентів сперматозоїдів в умовах дії на них іонізуючого опромінення.

НАУКОВА НОВИЗНА. Вперше вивчено функціональний стан та структурну основу реакції чоловічих гамет на гама-опромінення в широкому діапазоні доз. На основі комплексних електронномікроскопічних, цитохімічних методів дослідження у поєднанні із традиційними методами визначення рухливості і життєздатності встановлена кореляція між структурними, функціональними і деякими ензиматичними змінами в опроміненні чоловічих статевих клітинах. Виявлено, що провідну роль в променевому ураженні цих клітин відіграє пошкодження ультраструктури плазмолем, мембран акросоми та системи енергозабезпечення клітин. Вперше показаний тісний зв'язок деструкції плазматичних мембран та мембран внутрішньоклітинних органел чоловічих гамет в умовах іонізуючого опромінення з різкою активацією процесів перекисного окислення ліпідів. Встановлено важливу ланку дистрофічного процесу і висунуто науково обгрунтовану необхідність застосування біологічно активних мембранотропних препаратів, що стимулюють процеси захисту клітинних структур від дії іонізуючого опромінення. За допомогою якісного і кількісного аналізу структур вперше встановлено позитивний вплив інгібітора перекисного окислення ліпідів на ультраструктуру мембранних компонентів чоловічих статевих клітин в умовах іонізуючого опромінення. Показано, що застосування альфа-токоферолу суттє-

во знижує вміст високотоксичних продуктів перекисного окислення ліпідів в суспензії сперматозоїдів. На субклітинному та цитохімічному рівнях встановлено позитивний вплив екзогенного альфа-токоферолу на структурно-метаболичні процеси сперміїв, їх функціональну активність (рухливість). Отримані дані розширюють свідчення про механізми дії цього радіопротектора і показують патогенетично обгрунтовану доцільність його використання.

ТЕОРЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ полягає в установленні в гама-опромінених сперміях патологічних змін, які обумовлені дестабілізацією та деструкцією плазмолем, мембран акросоми та системи енергопостачання клітин, а також порушенням структури і функції їх локомоторного апарату, що розширює існуючі уявлення про причинні фактори зниження або відсутності запліднюючої здатності радіоушкоджених чоловічих статевих клітин.

НАУКОВО-ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. У зв'язку із тим, що цитоензимологічне та хемілюмінесцентне вивчення є одним із об'єктивних критеріїв функціонального стану сперматозоїдів, воно дає можливість здійснювати контроль за ефективністю антиоксидантної корекції. Доцільно включення цих методів в арсенал методів експериментальних та клінічних лабораторій, які вивчають цитофізіологію чоловічих гамет.

Установлення захисного впливу на морфофункціональний стан сперміїв альфа-токоферолу, що може бути використано для протипроменевого захисту сперматозоїдів при різних формах радіаційної дії на організм, а також при лікуванні чоловічої неплідності неясного генезу, які супроводжуються активацією перекисного окислення ліпідів.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЯКІ ВИНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Опромінення сперматозоїдів викликає в них комплекс морфофункціональних змін, глибина яких залежить як від величини дози, так і її потужності.

2. Провідними морфофункціональними ознаками радіаційного пошкодження сперматозоїдів в діапазоні доз 5-30 Гр є порушення ультраструктури плазмолем та мембран акросоми та мітохондрій, а при дозах 150-3000 Гр також пошкодження апарату руху чоловічих статевих клітин.

3. Структурні порушення сперміїв супроводжуються зміною активності сукцинатдегідрогенази, лактатдегідрогенази, а при дії доз вище 30 Гр також порушеннями їх поступального руху, що відображає взаємозалежність цих показників.

4. Екзогенний антиоксидант (альфа-токоферол) виявляє протектор-

ний вплив на структуру, активність окисних ферментів (сукцинатдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа), а також функціональний стан гама-опромінених чоловічих статевих клітин.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Основні положення дисертації були викладені на Радіобіологічному з'їзді (м.Київ, 1993); Республіканській науково-практичній конференції "Фундаментальні та клінічні аспекти сучасної реабілітації" (м.Полтава, 1995); конференції "Актуальні питання морфології" (м.Тернопіль, 1996).

ПУБЛІКАЦІЇ. За темою дисертації опубліковано 8 робіт, які повністю відображають зміст дисертаційної роботи.

ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Результати дослідження впроваджені в науково-дослідну роботу та учбовий процес на кафедрах гістології та ембріології НМУ ім. О.О.Богомольця, Київського медичного інституту УАНМ, Тернопільського медичного інституту, Кримського сільськогосподарського інституту.

СТРУКТУРА ТА ОБ'ЄМ РОБОТИ. Дисертаційна робота викладена на 240 сторінках. Робота включає вступ, аналітичний огляд літератури, розділ, що характеризує матеріал і методи дослідження, розділ власних досліджень, розділ обговорення результатів дослідження, висновки. Дисертація ілюстрована 50 мікрофотографіями, 4 гістограмами, 2 таблицями. Список цитованої літератури включає 293 бібліографічних посилань, з яких 150 - зарубіжні.

ОСОБИСТИЙ ВНЕСОК ДИСЕРТАНТА у розробку наукових результатів, що виносяться на захист. Автором самостійно здійснено постановку експериментів, забір матеріалу, проведення вітальних, електронномікроскопічних, гістохімічних досліджень, статистична обробка отриманих цифрових даних, аналіз отриманих результатів, їх узагальнення, формулювання висновків, теоретичних та практичних рекомендацій, оформлення роботи.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проводилися на 315 статеводозрілих самцях мишей інбредної лінії C57BL/6 масою 25-30 г. розводки віваріїв науково-дослідних інститутів фізіології та молекулярної біології і генетики НАН України. Всі тварини знаходилися на однаковому харчовому та водному режимі і утримувались в однакових умовах.

Після евтаназії, що досягалася дислокацією шийних хребців під ефірним наркозом, у тварин вилучали над'ячки, які поміщали в ізото-

нічний розчин хлориду натрія при кімнатній температурі.

Тварини були розділені на три групи:

1) 110 мишей були інтактним контролем;

2) на тваринах другої групи (140 мишей) вивчались реакції статевих клітин хвостового відділу над'яєчка на дію іонізуючої радіації *in vitro*. З цією метою проводилось одноразове опромінення вилучених придатків, які розміщували в скляних бюксах з 0,9% розчином хлориду натрія при кімнатній температурі. Для опромінення використовувалась установка з джерелом гама-опромінення ^{60}Co "УК-250000" та "АГАТ-Р". Для гама-опромінення використовувались дози: 3, 15, 30, 70, 150, 300, 3000 Гр. З метою вивчення тривалості опромінення використовували різні потужності доз: 0,16 Гр/сек, 0,02 Гр/сек, 0,025 Гр/сек, 0,53 Гр/сек. Вітальні, цитохімічні, електронномікроскопічні та біохімічні дослідження, а також фіксацію клітин для електронномікроскопічного вивчення проводили через три години після закінчення сеансу опромінення;

3) на тваринах третьої групи (50 мишей) вивчалася радіопротекторна дія альфа-токоферолу. Тваринам до опромінення внутришньочеревинно вводили жиророзчинний альфа-токоферол ацетат (Сметорол, Чехія) в дозі 300 мг/кг на протязі 10 днів. Дозування препаратів було складене з урахуванням результатів досліджень Aitken R.H. (1990). Частині тварин з контрольної групи цього експерименту (25 мишей) вводили фізіологічний розчин.

Спермії експериментальних тварин, що використовували в дослідках *in vitro*, вивчались у наступній послідовності.

1) Отримання суспензії сперматозоїдів. У кожній із тварин відпарувували хвостові відділи придатків над'яєчка (cauda epididymis) та сім'явиносні протоки (vas deferentia). Їх розміщували в 0,5 мл теплого ($t=37^{\circ}\text{C}$) фізіологічного розчину або в такій же аликвоті середовища 199. За допомогою парувального мікроскопу (МБИ-10), використовуючи тонкі глазні пінцети, проколювали стінку vas deferentia та обережно видавлювали їх вміст. Після ресуспендування сперму інкубували в стерильних пробірках для мікропроб при температурі 37°C у вологій атмосфері на протязі 25 хвилин.

2) Підрахунок кількості рухливих сперматозоїдів та визначення характеру їх руху проводили в камері Горяєва за допомогою методу, запропонованого Talbot P. та Chacon R.S. (1981). Результат виражався у відсотках до загальної кількості вивчених клітин.

3) Для визначення життєздатних чоловічих статевих клітин та пе-

ребігу акросомної реакції у опромінених спермійв мишей застосовували метод потрійного пофарбування (Talbot P., Chacon R.S., 1981). Препарати досліджували у світлооптичному мікроскопі при збільшенні 1000. При мікроскопічному вивченні підраховувались у випадковій виборці 100 клітин в одній пробі.

4) Цитохімічне дослідження активності ферментів - сукцинатдегідрогенази (СДГ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ) в чоловічих статевих клітинах проводили за методами Кононского А.И. (1976) та Лойда З. з співавт. (1982) з використанням солей тетразолія як акцептора електронів. Для більш об'єктивного аналізу отриманих даних нами використовувався напівкількісний метод оцінки цитохімічних реакцій в сперміях на основі розрахунку середнього цитохімічного показника (СЦП) (Чекарева Г.А. и др., 1982). Отримані дані обробляли за допомогою метода варіаційної статистики.

5) Електронномікроскопічні дослідження сперматозоїдів (трансмісійна та скануюча електронні мікроскопії). Для трансмісійної електронної мікроскопії суспензію сперматозоїдів фіксували 1% розчином глютаральдегіду в 0,1 М фосфатному буфері (рН - 7,2) і дофіксували в 1% чотирьохокису осмію. Дегідратацію матеріалу проводили за загальноприйнятою методикою у спиртах висхідної концентрації та ацетоні і заливали в суміш епону та аралдіту. Ультратонкі та напівтонкі зрізи виготовляли на ультрамікротомі системи LKB (Швеція), контрастували ураніацетатом, цитратом свинцю за Рейнольдсом (Уикли Б., 1975). Перегляд та фотографування зрізів проводили на електронних мікроскопах EMВ-100БР, EM-125, JEM-100 та JEM-1200 EX (JEOL Company Ltd., Японія) при прискорюючій напрузі 75 кВ та збільшеннях 10-80000 X. Підготовку препаратів для скануючої електронної мікроскопії здійснювали за методом Menkveld E. та Swanson R.J. (1991). Виготовлені зразки вивчали за допомогою скануючого мікроскопу JSM-35C. Ці спостереження були проведені при прискорюючій напрузі 20 кВ та збільшеннях 2000-20000 X. Фотографування об'єктів проводили за допомогою фотоапарата "Мамія" (Японія).

6) Біохемілюмінесценція сперматозоїдів. За допомогою метода хемілюмінесценції за допомогою хемілюмінометра БХЛ-6 (СРСР) вивчали співвідношення інтенсивності перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної активності сперматозоїдів за методом Владимирова Ю.А. та Арчакова А.И. (1972).

Обробка цифрових даних усіх розділів досліджень проводилась з використанням методу варіаційної статистики (Плохинский Н.А., 1980).

Достовірність відмінностей середніх величин і їх помилок визначалась за критерієм Стьюдента-Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

МОРОФОНУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЧОЛОВІЧИХ ГАМЕТ МИШЕЙ В УМОВАХ ГАМА-ОПРОМІНЕННЯ В ШИРОКОМУ ДІАПАЗОНІ ДОЗ. Установлена в поданій роботі динаміка субмікроскопічних альтеративних змін опромінених спермій характеризується певною послідовністю. У відповідь на опромінення в дозах 3-10 Гр першою реагує плазмолема спермій. Так, уже в ранній пострадіаційний період порушується її конфігурація, що проявляється значною складчатістю, виникненням множинних інвагінатів. Мембранні компоненти внутрішньоклітинних органел проявляють більшу резистентність, ніж плазматична мембрана. Характерною реакцією з боку мітохондрій переважної більшості клітин є підвищення електронної щільності матриксу, а також чітка контурованість крист, що свідчить про їх значне функціональне навантаження. Цитохімічні дослідження свідчать про достовірне підвищення активності СДГ і ЛДГ (відповідно 268.00 ± 1.95 і 263.00 ± 2.14 ум.од.) в гама-опромінених сперміях. Такий рівень ензиматичної забезпеченості гамет може обумовлювати підвищення їх рухливості, що спостерігається в дослідах *in vitro*. Причому більшість клітин зберігають здатність до прямолінійно поступальних переміщень.

При підвищенні доз радіації до 15 Гр альтеративні зміни спермій наростають у порівнянні з експериментами із застосуванням менших доз. Переважають спермії (40-60%) з множинними інвагінатами плазмолемі в апікальному сегменті, із яких потім формуються везикули. Нерідко спостерігається клазмацитоз - відокремлення ділянок цитоплазми апікального сегменту головки. Посилення везикулоутворення та клазмацитоз є однією із ранніх реакцій клітин на різноманітні шкідливі впливи (Авцын А.П., Шахламов В.А., 1979). Зміна цитоархітекτονіки цих гамет, можливо, обумовлена вираженим зменшенням мікрров'язкості і збільшенням плинності мембран.

Характерною особливістю реакції чоловічих гамет на дію іонізуючої радіації в указаній дозі є "шедінг" - відшарування плазматичної мембрани, порушення її цілісності та скидання фрагментів у міжклітинне середовище, а також псевдомієлінізація - утворення мієліноподібних структур, виникнення яких ймовірно ініціюється внаслідок розриву та скручування фрагментів плазмолемі і є одним із проявів ін-

тенсифікації ПОЛ (Авцын А.П., Шахламов В.А., 1979; Chang M.C., Schuel H., 1990; Носов А.Т. и др., 1994). Виражені деструктивні зміни поверхневого апарату гамет супроводжуються явищами значного внутрішньоклітинного набряку.

Дуже чутливі до опромінення в дозі 15 Гр мітохондрії. Загальним в реакції цих органел є інтенсивнее набрякання матриксу, що приводить до перетворення їх в крупні вакуольоподібні утвори із електроннопрозорим вмістом. При цьому лише деякі з них виявляють високу осмієфільність матриксу. На ранніх етапах радіаційного пошкодження особливо демонстративне зменшення загальної поверхні їх крист. Однак найбільш показовою ознакою зміни функціональної активності сперміїв є значне зменшення активності СДГ (219.00 ± 4.77 ум. од., тоді коли в контролі 269.00 ± 7.30 ум. од.). Відмічені зрушення у вмісті СДГ корелюють із різницею у відношенні загальної поверхні їх внутрішніх мембран до об'єму матриксу. Тому виявлені при дії гама-опромінення зміни мітохондрій, певно, свідчать про пригнічення енергоутворюючої функції цих органел, і тим самим про загальне зниження рівня окисно-відновлювального фосфорилування.

В умовах одноразового опромінення сперматозоїдів в дозах 30-70 Гр порушення поверхневого апарату проявляються значними випинаннями клітинної мембрани апікальних сегментів головки, очевидно, в результаті накопичення внутрішньоклітинної рідини, що супроводжується відшаруванням плазмолем на значну відстань від внутрішньоклітинних органел та її фрагментацією. Зазначені зміни плазматичних мембран чоловічих гамет, а також швидке збільшення об'єму клітини можуть свідчити про максимальне набрякання гамет.

Найбільш характерною реакцією сперміїв на дію іонізуючого опромінення за цих експериментальних умов є суттєве порушення ультраструктурної організації акросомного апарату, яке проявляється порушенням цілісності зовнішньої і внутрішньої акросомних мембран, а також різким просвітленням акросомального матриксу, що свідчить про спустошення акросоми. Локальне пошкодження мембранних структур акросоми, яке обумовлене безпосередньою дією радіації або доураженням протеолітичними ферментами акросомального матриксу, може бути причиною деструкції розташованої поруч нуклеолем та локальним просвітлінням хроматину. Такі структурні порушення чоловічих статевих клітин на думку Люлько А.А та Стусь В.П. (1995) ведуть до втрати ними не лише здатності до пенетрації, але і до донації повноцінної генетичної інформації.

У серединному сегменті хвостового відділу більшої частини сперміїв (75%) рееструються мітохондрії, які мають ознаки різкого набрякання - дифузне просвітління матриксу. При цьому відмічається деструкція крист, частіше вони взагалі не виявляються. Зміна активності СДГ корелює із показниками ультраструктури мітохондрій і заключається у вираженому її падінні - 176.00 ± 11.39 ум.од.. Поряд з тим в цих дослідах визначається зниження активності також ЛДГ - 99.00 ± 5.26 ум.од.. Наявність в окремих клітинах крупнодиспергованих поліморфних відкладень формазау, які визначаються при проведенні гістохімічної реакції по виявленню СДГ, також свідчить про пошкодження мембран мітохондрій. Аналізуючи власні результати і порівнюючи їх із даними біохімічних та гістофізіологічних досліджень (Береговская Н.Н. и др., 1994), можна зробити висновок, що однією із початкових ланок альтерації системи енергозабезпечення статевих клітин під дією іонізуючого опромінення є роз'єднання процесів окисного фосфорилування.

Поряд з мітохондріями опроміненних в дозах 30-70 Гр сперматозоїдах значних пошкоджень зазнає руховий апарат, які характеризуються відсутністю окремих мікротрубочок аксонем, транслокацією щільних фібрил. Такі структурні порушення завжди поєднуються з достовірним різким зниженням рухової активності клітин в середовищі 199 (20.5%). При цьому поряд із збереженням незначною частиною сперматозоїдів здатності до руху у частини з них (20%) його характер змінюється. Це проявляється появою клітин із манежним (по кругу) переміщенням, а також гамет, що обертаються навколо своєї осі. Крім того, нерідко відмічається поява так званих флагелюючих клітин, які вібрують, залишаючись на місці. Ці факти відображають можливість зниження запліднюючої здатності сперміїв, оскільки в яйцеклітину можуть проникати лише спермії з поступально прямолінійним рухом.

Гама-опромінення суспензії чоловічих гамет в дозі 150 Гр викликають деструктивні порушення, які в ряді проявів виражені менше, ніж в експериментах із застосуванням нижчих дозових навантажень. Так, інтенсивність альтерації мітохондрій, яка проявлялася редукцією числа крист, супроводжується підвищенням активності СДГ (144.00 ± 7.31 ум.од.). При цьому відмічається перерозподіл кінцевих продуктів гістохімічних реакцій між серединним відділом хвоста та головкою. У чоловічих гамет даної групи експерименту більш висока активність ферменту визначається в постакросомній ділянці головки, тоді, коли у інтактних сперміїв активність СДГ, як відомо, виявляється в серединному відділі. Це може бути пов'язане із радіоіндукованим підвищенням

плинності фосфоліпідного компоненту плазматичної та мітохондріальних мембран гама-опромінених чоловічих статевих клітин, зміною локалізації кінцевих продуктів гістохімічних реакцій, наслідком якої є падіння ферментної активності. Перерозподіл активних типів окисно-відновлювального ферменту обумовлює порушення локомоторної функції гамет. Одночасно спостерігається підвищення активності ферменту гліколізу - ЛДГ (188.00 ± 9.95 ум.од.).

Реакція чоловічих гамет на одноразову дію іонізуючої радіації в дозі 1500 Гр характеризується появою аглютинованих сперміїв, у яких частіше всього спостерігається кон'югація плазмолем в області екваторіальних сегментів головок, рідше - злиття головок із конгломератами хвостових відділів. Можна припустити, що дія на чоловічі гамети значних доз іонізуючого опромінення в порівнянні з меншим дозовим навантаженням викликає у них посилення міжклітинної агрегації. Це може бути обумовлено порушенням цитоскелету, елементи якого тісно пов'язані як з ліпідним бімолекулярним шаром клітинної мембрани, так і з глікокаліксом.

Характерною особливістю реакції чоловічих гамет на опромінення в дозі 1500 Гр є їх різке зневоднення, про що свідчить збільшення електронної щільності всіх внутрішньоклітинних органел і зокрема акросомального матриксу, який набуває пластівчастого вигляду. В периакросомальній ділянці часто зустрічаються кристалоподібні структури, а в перинуклеарній зоні - гомогенний електроннощільний матеріал.

Однією із типових форм альтеративних змін радіоопромінених в дозах 300-3000 Гр сперміїв є грубе порушення ультраструктурної організації цитоскелетних структур шийки - різке просвітління смугастих стовпчиків та деструкція центріолей, результатом чого є збільшення декапітованих гамет, яке спостерігається з найбільшою очевидністю в культурі *in vitro*. Найбільший ступінь вираженості цього явища реєструється при опроміненні в дозах з верхньою границею 3000 Гр. Слід відмітити, що хвостові відділи деяких декапітованих сперміїв зберігають рухливість, при чому рух окремих флагел залишається прямолінійно поступальним.

Реакція мітохондрій характеризується збільшенням електронної щільності матриксу, редукцією числа крист. в частині органел вони не виявляються. Одночасно в діапазоні доз від 300 до 3000 Гр відмічається тенденція до збільшення активності як СДГ (188.00 ± 9.95 ум.од.), так і ЛДГ (144.00 ± 7.31 ум.од.) з незначним падінням цих показників при опроміненні в дозі 3000 Гр - СДГ (176.00 ± 5.97 ум.од.) і

ЛДГ (137.00 ± 0.89 ум. од.)

В серединному та дистальному відділах хвоста виявляються кількісні та топографічні порушення цитоскелетних структур аксонями, або ж повна їх дезорганізація, що може бути пов'язано із деполімерізацією тубулінів, які входять до складу мікротрубочок.

Патологічні зміни рухового апарату більшої частини гамет, які спостерігаються в пострадіаційний період можуть бути морфологічним субстратом зниження показників функціонального стану сперміїв, опромінених в дозах 300- 3000 Гр. Так, кількість рухливих клітин знижується (35 ± 6 ; $24 \pm 6\%$ відповідно), в той же час незначна частина клітин здатна до млявих, повільних та неефективних рухів (так звана астеноспермія), що може бути вираженням як агонії клітини, так і дефектів локомоторного апарату клітин.

При дозі 300 Гр кількість живих клітин становить 87 8%, а при максимальному дозовому навантаженні 3000 Гр - 80 8%. Поясненням виявленого ефекту може бути феномен загибелі клітин, для якої властива наявність вираженого порога радіочутливості, вище якого швидкість накопичення порушень не залежить від дози (Хансон К.П., 1979).

Таким чином, отримані результати показують, що одноразове гамма-опромінення в широкому діапазоні доз виявляється в порушенні ультраструктурної організації сперматозоїдів, в зменшенні їх життєздатності, а також - рухливості та поєднується з достовірним падінням активності ферментів гліколізу та окислювального фосфорилування в статевих клітинах. Проведені дослідження дозволяють вважати, що пошкодження плазматичних і внутрішньоклітинних мембран є важливою патогенетичною ланкою у розвитку виражених функціональних змін чоловічих гамет, від стану яких в значній мірі залежать процеси запліднення.

ПЕРЕКИСНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ СПЕРМАТОЗОЇДІВ МИШЕЙ ПІСЛЯ ГАМА-ОПРОМІНЕННЯ. До тепер накопичено значний експериментальний матеріал, який переконливо доводить важливу роль вільнорадикальних реакцій в механізмах променевого ураження біологічних тканин (Бурлакова Е.Б. і др., 1975; Кузин А.М., 1986; Ferrandi V. et al., 1989). Основними об'єктами пошкоджуючої дії окисних радикалів стають хроматин клітинного ядра і ненасичені жирні кислоти мембранних фосfolіпідів (Кудряшов Ю.Б., 1987). Висока чутливість чоловічих гамет до токсичних метаболітів ліпопероксидації пов'язана з високою концентрацією поліненасичених жирних кислот, обмеженою можливістю сперматозоїдів до процесів репарації, дефіцитом антиоксидантних ферментів (Aitken R.J. 1990; 1992; Baker H.W.G. et al., 1996).

Результати, які були отримані при хемілюмінесцентному дослідженні суспензії інтактних спермій, свідчать про те, що при ініціації перекисного окислення ліпідів двошвалентним залізом в їх мембранах легко здійснюються вільнорадикальні реакції.

Як відомо, сперматозоїди деяких видів ссавців і людини характеризуються надзвичайною здатністю генерувати токсичні види кисню, включаючи супероксид аніон і перекис водню (MacLeod J., 1943; Iwasaki A., Gagnon C., 1992). Хоча біологічне значення таких реакційоздатних метаболітів кисню ще не визначена, їх роль в патофізіологію порушень функцій сперматозоїдів була установлена багатьма дослідженнями (Jones R. et al., 1979; Aitken R.J. et al., 1988).

Хемілюмінесцентне дослідження суспензії спермій мишей в умовах одноразового опромінення в дозі 5 Гр показує зростання інтенсивності свічення у відповідь на активуючу дію такого прооксиданта, як двошвалентне залізо, хоча воно в 5 разів менше порівняно із значеннями інтактних тварин, і свідчить про порушення антиоксидантної системи. Значний вміст високотоксичних продуктів перекисного окислення ліпідів, за даними ряду дослідників, є пусковим механізмом пошкодження мембранних структур клітин (Эмануэль Н.М., 1979; Барабой В.А., 1991; Губский Ю.И., 1989; Наук В.А., 1991). В дослідях Aitken R.J. та співавт. (1988), Kesselopolou E. і співавт. (1995), Baker H.W.G. et al. (1996) було установлено, що в мембранах спермій людини високий рівень перекисного окислення ліпідів приводить до втрати рухливості гамет та здатності їх мембран до злиття з оолеомою під час запліднення.

Деструктивні зміни клітинних і внутрішньоклітинних мембранних структур, які були установлені в даній роботі при проведенні ультраструктурних досліджень, указують на певне розходження біохімічних і морфологічних даних. Якщо на 3 годину після опромінення відмічається незначна активації перекисного окислення ліпідів, то зміни цитоархітектоніки мембран продовжують наростати. Очевидно, це можна пояснити тим, що компенсаторне посилення потужності ендогенних антиоксидантних систем, яке має місце в ранній пострадіаційний період (0 - декілька хвилин), недостатнє для повного усунення вільнорадикальних реакцій, які розвиваються в мембранних структурах гама-опроміненних спермій, і процес деструкції продовжує прогресувати у більш віддалений пострадіаційний період (3 години після опромінення), знижуючи при цьому функцію гамет.

ВПЛИВ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛУ АЦЕТАТУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ, ЦИТОХІМІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ПОКАЗНИКИ ЧОЛОВІЧИХ СТАТЕВИХ КЛІТИН В УМОВАХ ГАМА-ОПРОМІНЕННЯ. Викладені факти дають підставу для припущення можливості підвищення радіорезистентності сперміїв при застосуванні антиоксидантів, сприянню збереження ультраструктурних компонентів статевих клітин та їх функціональної активності. В останні роки накопичено значний матеріал, який свідчить про те, що альфа-токоферол - один із структурних компонентів мембранних органел клітини - захищає поліненасичені жирні кислоти біологічних мембран, обриваючи ланцюгову реакцію вільнорадикального окислення (Kesselopolou E. et al., 1995).

Електронномікроскопічне дослідження стану опромінених в дозі 5-15 Гр чоловічих гамет тварин, які отримували альфа-токоферол, свідчить про краще збереження мембранних компонентів клітини уже в ранні строки спостереження, що особливо добре помітно на прикладі плазмолемі сперміїв. Остання зберігає чіткі контури і щільно прилягає до внутрішньоклітинних органел. Захисний вплив виявляє інгібітор перекисного окислення в ці строки спостереження і на ультраструктурний стан акросоми. Перш за все це характеризується більшою радіорезистентністю зовнішньої та внутрішньої акросомних мембран. Вони чітко контуровані, зберігають цілісність на всьому своєму протязі.

Результати вивчення ультраструктури серединного сегмента опромінених чоловічих гамет тварин після введення альфа-токоферолу також свідчать про підвищення радіорезистентності ультраструктури мембранного компонента поверхневого апарату і цитоплазми цього відділу сперміїв.

В дослідах з введенням альфа-токоферолу тваринам перед опроміненням відмічається гетерогенність реакції мітохондрій сперміїв на опромінення. Так, поряд із окремими органелами, які мають ознаки деструктивних змін (локальне просвітління центральних або периферійних ділянок мітохондріального матриксу, редукція числа крист), зустрічається частина мітохондрій, які мають ультраструктуру близьку до нормальної. В значній кількості реєструються гіпертрофовані органели з високою електронною щільністю мітохондріального матриксу та збільшеним числом розширених крист. В жодній з цих органел деструкція мембранних компонентів не визначається. Висока щільність матриксу свідчить про надлишок АТФ в оточуючому середовищі, тобто, певно, про підвищений рівень клітинної енергетики (Токин І.Б., 1974), і відповідає максимальному функціональному навантаженню цих органел. Гетерогенність реакції мітохондрій, яка має місце як в межах всієї попу-

ляції чоловічих гамет, так і в межах однієї і тої самої клітини, може бути пов'язана із різною швидкістю репаративних і компенсаторних процесів у різних органелах, обумовленою дією альфа-токоферолу.

Мембраностабілізуючий ефект при введенні антиоксиданта по відношенню до мітохондрій сперматозоїдів підтверджується достовірним збереженням високого рівня активності СДГ ($219 \pm 4,77$ ум.од.), що супроводжується пониженням рівня ЛДГ ($234 \pm 5,28$ ум.од.). Перебудову метаболізму в статевих клітинах, яка спостерігається під впливом альфа-токоферолу, можна охарактеризувати як направлену на пригнічення гліколітичних процесів і відносну активацію процесів аеробіозу.

Ведення альфа-токоферолу тваринам до опромінення позитивно впливає на ультраструктуру хвостового відділу сперматозоїдів. Фібрилярний апарат аксонемі має впорядковану "9x2+2" будову, характерну для інтактних тварин. Збереження субмікроскопічної організації флагелли сперматозоїдів корелює із збереженням їх функціональної активності, а саме збереженням процентного вмісту клітин, які мають прямолінійно поступальний рух до $64 \pm 5\%$ (при опроміненні $53 \pm 5\%$).

В умовах застосування антиоксиданту хемілюмінесцентними дослідженнями встановлено достовірне зниження рівня продуктів перекисного окислення ліпідів порівняно із контрольною групою. Так, інтенсивність хемілюмінесценції суспензії сперматозоїдів в 3,5 раза нижча, ніж у опромінених гамет тварин, які не отримували антиоксидант. Дані біохімічних і морфологічних досліджень збігаються і свідчать про протекторну дію цього інгібітора перекисного окислення ліпідів на мембрани сперматозоїдів при дії іонізуючого опромінення.

Таким чином, результати експерименту із застосуванням альфа-токоферолу доповнюють уявлення про причини порушення структури, функції і метаболізму гама-опромінених сперміїв і свідчать, що цей антиоксидант володіє інгібуючою дією на вільнорадикальний тип окислення і є ефективним засобом стабілізації структури і функції сперміїв в умовах опромінення.

ВИСНОВКИ

1. Одноразове гама-опромінення сперматозоїдів мишей, отриманих із над'ячка, викликає в них комплекс морфофункціональних змін, ступінь вираженості яких залежить від величини дози радіаційної дії. Найбільш значні пошкодження цих клітин виникають в умовах проведених експериментів при використанні доз в діапазоні 30-70 Гр.

2. Альтеративні зміни чоловічих гамет, викликані гама-опроміненням, знаходяться у зворотній залежності від часового фактора. В умовах дії невеликих доз, але тих, що впливають протягом довшого часу, фактор пошкодження виявляється більш значним, ніж при дії цієї ж потужності опромінення в короткий проміжок часу.

3. Провідною ознакою, яка відображає порушення структури сперматозоїдів при гама-опроміненні, є деструктивні зміни плазмолемі, мембран мітохондрій та акросоми.

4. Іонізуюче опромінення в діапазоні доз 3-5 Гр викликає у незначної частини сперміїв зворотні зміни їх найтоншої будови, приводить до активації в них окисних ферментів (сукцинатдегідрогенази та лактатдегідрогенази), яка супроводжується підвищенням рухової активності цих клітин *in vitro* із збереженням ними здатності до прямолінійно поступального руху. В цих умовах в сперматозоїдах у ранній пострадіаційний період активується вільнорадикальне окислення ліпідів.

5. При дії іонізуючого опромінення (в межах 30-70 Гр) зміни структури переважної більшості сперматозоїдів виявляються більш суттєвими. Вони проявляються деструкцією плазмолемі, мембран мітохондрій і акросоми з достовірним зниженням в цих клітинах активності сукцинатдегідрогенази та лактатдегідрогенази, а також порушенням рухливості, яка характеризується зміною поступального руху сперматозоїдів на манежне (по колу) і флагелююче переміщення, при якому клітини вібрують залишаючись на місці.

6. В умовах гама-опромінення чоловічих статевих клітин в діапазоні доз (150-3000 Гр) виникає аглютинація значної частини клітин, яка є результатом глибокого пошкодження плазмолемі. При цьому виникають деструктивні зміни цитоскелетних структур аксономи хвостового відділу чоловічих статевих клітин, які не виключають їх залишкову рухливість, що проявляється млявими рухами (астеноспермія)с

7. Для дегенеративно-деструктивних процесів гамет існує наявність вираженого порога радіочутливості, вище якого швидкість накопичення порушень не залежить від дози опромінення. При опроміненні сперміїв у дозах, які перевищують 70 Гр, їх загибель, що проявлялася пікнозом ядер, була значно меншою, ніж в діапазоні тисяч греїв.

8. Парентеральне введення підослідним тваринам екзогенного антиоксиданта (альфа-токоферолу) супроводжується зниженням інтенсивності хемілюмінесценції суспензії епідидимальних сперміїв, що указує на інгібуючу дію цього антиоксиданту на вільнорадикальний тип окис-

лення і ефективність даного засобу в стабілізації структури і функції сперміїв в умовах опромінення.

9. Головними об'єктами радіозахисного впливу альфа-токоферолу в умовах гострого іонізуючого опромінення сперматозоїдів є мембранний апарат клітин (плазмолема, мембрани систем енергозабезпечення та акросоми) і руховий апарат.

10. Протекторний ефект альфа-токоферолу в умовах одноразового опромінення сперміїв в дозах 5-15 Гр проявляється в збереженні активності окисно-відновлювального ферменту (сукцинатдегідрогеназа) та в зниженні активності ферменту гліколізу (лактатдегідрогеназа), що результується достатньо високою руховою активністю сперміїв *in vitro*.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Ультраструктура чоловічих гамет при дії іонізуючого опромінення//Український радіологічний журнал.- 1994.- №1.- С.35-41. Робота виконана самостійно.

2. Вплив альфа-токоферолу ацетату на функціональні, цитохімічні та ультраструктурні показники чоловічих статевих клітин при гама-опроміненні//Український медичний молодіжний журнал.- 1995.- № 4.- С.4-8. Робота виконана самостійно.

3. Развитие морфологических изменений в структуре гамма-облученных сперматозоидов в пострационационный период//Радиобиологический съезд:Тез. докл. -Пушино, 1993.- С.17-18 (в співавторстві з Андрейченко С.В., Нурищенко Н.Є.).

4. Влияние гамма-радиации на двигательную активность сперматозоидов лабораторных животных//Радиобиологический съезд:Тез. докл. -Пушино, 1993.- С.90-91 (в співавторстві з Андрейченко С.В., Нурищенко Н.Є.).

5. Особливості мікро- та ультраструктурних змін гама-опроміненних сперматозоїдів мишей//Актуальні питання морфогенезу/Матеріали наукової конф.- Чернівці, 1994.- С.22-23 (в співавторстві з Андрейченко С.В.).

6. Реакция сперматозоидов мышей на острое воздействие ионизирующей радиации//Фундаментальные и клинические аспекты современной реабилитации/ Материалы республ. научно-практич. конф.- Полтава, 1995.- С.199 (в співавторстві з Волошенко Т.Г.).

7. Радіаційне порушення структури та окисно-відновлювальних реакцій мітохондрій чоловічих гамет//Актуальні питання морфогене-

зу/Матеріали наук. конф. - Чернівці, 1996. - С. 35-36 (в співавторстві з Щербак Л. Ф.).

8. Вплив альфа-токоферолу на ультраструктурну організацію чоловічих статевих клітин при гама-опроміненні//Актуальні питання морфології/Зб. наук. робіт. - Тернопіль, 1996. - С. 78. Робота виконана самостійно.

Bidna L.P. Morphologic and functional study of male gamets of mice under influence of wide-ranged doses gamma-radiation and alfa-tocopherol use.

Thesis to obtain the Candidate of Biological Sciences scientific degree in speciality 03.00.11 - embryology, histology and cytology. The Taras Shevchenko Kiev University. Kiev, 1996.

The 9 published works containing the results of the study of morphologic and functional changes of male gametes under irradiation and the influence of alpha-tocopherol on the degree of their appearance, are being maintained. Alterations of cell membrane structure, intracellular membranes of acrosome and mitochondria, locomotor apparatus of male gametes as leading morphofunctional signs of radiational damage of male gametes are revealed. The ultrastructural damage is considerably extent due to dramatical activation of lipid peroxidation and accompanies with changes of LDG and SDG activities, and the progressive movement of gametes, reflecting mutual dependency of these signs. The use of alfa-tocopherol lowers excessive levels of peroxidation and, thus, protects the structure of gamma-irradiated male germ cells, enzyme oxidative activities and functional activity of gametes.

Бедная Л.П. Морфофункциональное изучение мужских гамет мышей в условиях гамма-облучения в широком диапазоне доз и воздействия альфа-токоферола.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 - эмбриология, гистология и цитология, Киевский университет им.Т.Г.Шевченко, Киев, 1996.

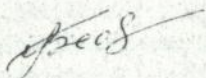
Защищаются 9 опубликованных научных работ, которые содержат результаты исследований морфофункциональных изменений мужских гамет при ионизирующем облучении и влияния антиоксиданта на степень их проявления. Установлено, что ведущими морфофункциональными признаками радиационного повреждения сперматозоидов является нарушения струк-

438431

туры плазмолемы и внутриклеточные повреждения аппарата деления, а также структурные нарушения сперматозоидов в значительной степени обусловлены резкой активацией перекисного окисления липидов и сопровождаются изменением активности СДГ, ЛДГ, а также нарушениями их поступательного движения, что отображает взаимозависимость этих показателей. Применение альфа-токоферола понижает избыточный уровень перекисидации, что оказывает протекторное влияние на структуру гамма-облученных половых клеток, активность окислительных ферментов, функциональную активность гамет.

Ключові слова: морфологія, чоловічі гамети, гама-опромінення, альфа-токоферол.

Автор



Л. П. Бідна

Підп. до друку 12.07.96 р. Формат 60X84/16. Папір офс.
Офс. друк. Ум. друк. арк. 0.93. Ум. фарбо-відб. 1.12.
Обл.-вид. арк. 1.0. Тираж 100 прим. Зам. 207

Дільниця ротапінтного друку ВНТІ ІПМіц. НАН України
252014, Київ-14, вул. Тимірязєвська, 2