

УДК: 611.013.2:611.361: 577.151.6

© Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.М., 2012

РОЛЬ ЦИТОХРОМУ Р-450 2Е1 У ПОРУШЕННІ РЕПРОДУКТИВНОЇ ЗДАТНОСТІ ЩУРІВ-САМЦІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ДІАБЕТОМ Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.М.

ДУ «Інститут фармакології і токсикології НАМН України»

Шаяхметова Г.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.М. Роль цитохрому Р-450 2Е1 у порушенні репродуктивної здатності щурів-самців зі стрептозотоциновим діабетом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 114-116.

Показано, що у сім'яниках щурів-самців з порушенням репродуктивної здатності, обумовленої експериментальним діабетом, зростали рівень експресії СYP2E1 та фрагментації ДНК. Висунуто припущення, що Індукція СYP2E1 у сім'яниках, може мати внесок до патогенетичних механізмів розвитку чоловічої неплідності при діабеті.

Ключові слова: діабет, сім'яники, ДНК, СYP2E1, щури-самці

Шаяхметова А.М., Бондаренко Л.Б., Блажчук І.С., Коваленко В.Н. Роль цитохрома Р-450 2Е1 в порушенні репродуктивної здатності криси-самця со стрептозотоциновим діабетом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 114-116.

Показано, що в семенниках криси-самця с порушенням репродуктивної здатності, обумовленої експериментальним діабетом, підвищалися ступінь експресії СYP2E1 та фрагментації ДНК. Висунуто припущення, що індукція СYP2E1 у семенниках, може мати внесок до патогенетичних механізмів розвитку чоловічої неплідності при діабеті.

Ключевые слова: діабет, семенники, ДНК, СYP2E1, криси-самці.

Shayakhmetova G.M., Bondarenko L.B., Blazhchuk I.S., Kovalenko V.M. Role of cytochrome P-450 2E1 in reproductive malfunction of male rats with streptozotocin-induced diabetes // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5. – С. 114-116.

It was shown increase of CYP2E1 expression and DNA fragmentation levels in testes of male rats with impaired by experimental diabetes reproductive capability. It is suggested that CYP2E1 induction in testes could have a contribution to pathogenetic mechanisms of male infertility development.

Key words: diabetes, testes, DNA, CYP2E1, male rats

Вступ. Цукровий діабет є значною медико-соціальною проблемою пріоритетною для систем охорони здоров'я практично всіх країн світу. Це захворювання згідно до класифікації ВООЗ знаходиться на третьому місці серед захворювань із високим рівнем летальності та інвалідизації [1]. Дуже часто основною проблемою хворих на діабет є порушення репродуктивної функції [2]. При діабеті спостерігається дисбаланс усіх фізіологічних механізмів, які забезпечують нормальне функціонування чоловічої статеві системи, що може негативно позначатись на фертильності [3]. Розуміння усіх ланок механізму розвитку чоловічого непліддя при діабеті є важливим для розробки ефективних заходів подолання даного ускладнення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в межах науково-дослідних бюджетних тем АМН 14.07 «Роль індукції цитохрому Р-450 2Е1 у процесах детоксикації та токсичної біотрансформації комбінації туберкулоостатиків у печінці та гонадах самців щурів» (№ держреєстрації 0107U000392) та АМН 01.10 «Механізми гепато- та гонадотоксичної дії протитуберкульозних лікарських засобів, зумовлені їх біотрансформацією в організмі (експериментальне дослідження) (№ держреєстрації 0110U001219) в ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Метою роботи було дослідження експресії цитохрому Р-450 2Е1 (СYP2E1) та фрагментації ДНК у сім'яниках щурів-самців з порушенням репродуктивної здатності, викликаної експериментальним діабетом.

Матеріали і методи. У дослідженні були використані щури-самці та самки лінії Вістар масою тіла 160 - 200 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до корму та води. Після 10-денного періоду акліматизації у щурів викликали

діабет одноразовим внутрішньоочеревинним введенням розчину стрептозотоцину (Sigma-Aldrich, США) в цитратному буфері (рН 4,5) з розрахунку 60 мг/кг маси тіла [4]. Контрольна група отримала лише цитратний буфер у відповідному об'ємі. Протягом 2-х тижнів контролювали рівень глюкози в крові тварин за допомогою глюкометра Smartest Optima (Biotest T Medical Corporation, Німеччина), після чого тварин рандомізували у дві групи: експериментальну та контрольну. До експерименту брали щурів з вмістом глюкози в крові більше за $16,5 \pm 0,8$ ммоль/л. Обидві групи включали не менше ніж по 6 тварин. Через 60 днів експерименту (період сперматогенезу з урахування періоду дозрівання сперматозоїдів в епидидимісі) щурів парували з інтактними самцями (у співвідношенні самець : самка – 1 : 2) протягом 15 днів (приблизно 2-3 естральні цикли). Після закінчення терміну парування самців під легким ефірним наркозом піддавали евтаназії дислокацією шийних хребців і виділяли сім'яники для оцінки стану сперматогенного епітелію за стандартними методиками [5], ступеню фрагментації ДНК, як це було описано раніше [6], та рівня експресії СYP2E1 методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ПАР). Виділення сумарної мРНК проводили з використанням TRI-Reagent (Sigma, США). Синтез кДНК проводили з використанням реактивів та протоколу фірми Fermentas (Германія). Склад реакційної суміші для ПАР, протоколи ампліфікації та праймери, специфічні для ПАР ампліфікації гена СYP2E1 були обрані відповідно до роботи S.M. Lankford і співавт. [7]. Праймери були синтезовані компанією «Metabion» (Германія). Для ампліфікації використовували термоциклер MyCycler (BioRad, США). Електрофорез продуктів ПАР СYP2E1-744 п.н. та референс гену β -актину-353 п.н. проводили в 2 % агарозному гелі. Гелі забарвлювали розчином бро-

мового етідію, візуалізували в УФ-світлі та фотографували в за допомогою системи GelDoc, (BioRad, США). Кількість мРНК CYP2E1 оцінювали за інтенсивністю смуг, використовуючи програму Quantity One BioRad System (США) та представляли у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту мРНК CYP2E1 до вмісту мРНК референс-гену β -актину. Самців піддавали евтаназії цервікальною дислокацією через 20 днів після початку парування та визначали показники, що характеризують запліднювальну здатність піддослідних самців та опосередкований батьком вплив на ембріональний розвиток [5]. Всі дослідження на тваринах були проведені відповідно до рекомендацій Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для

експериментальних та інших наукових цілей і схвалено Комісією по біоетиці ДУ "ІФТ НАМНУ".

Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Дані представляли як середнє значення \pm похибка середнього ($M \pm m$). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

Результати. Спостереження за самцями щурів зі стрептозотоциновим діабетом виявило зниження мотиваційного та копуляторного компонентів їхньої статевої поведінки. Результати, наведені в таблиці 1 свідчать, що індекс запліднювальної здатності тварин з діабетом був на 30% нижчим порівняно з інтактними самцями.

Табл. 1. Індекс запліднювальної здатності самців щурів зі стрептозотоциновим діабетом.

Групи самців	Кількість парованих самців	Кількість вагітних самиць	Індекс запліднювальної здатності
Контроль	20	20	100,0
Діабет	20	14	70,0

У таблиці 2 представлені показники ембріональної смертності в різні періоди антенатального розвитку потомства самців з експериментальним діабетом та інтактних самців. Вони свідчать, що за даних умов експерименту відбувалось порушення ембріонального розвитку потомства, яке позначалось на показниках смертності як в доімплантаційний період, так і в період після імплантації. Особливо чутливо виявилась стадія розвитку в

період після імплантації. Так, якщо показники ембріональних втрат доімплантаційного періоду в дослідній групі тварин були лише на декілька відсотків вищими порівняно з контролем, то рівень смертності плодів в післяімплантаційний період у цій групі був вищим у 3 рази. Це позначилось і на рівні загальної смертності, яка в дослідній групі тварин перевищила контрольні показники у 1,5 рази.

Табл. 2. Показники ембріогенезу на 20-й день вагітності інтактних самиць щурів, запліднених самцями зі стрептозотоциновим діабетом

Групи самців	Кількість вагітних у групі	Кількість жовтих тіл в яєчниках	Кількість місць імплантації	Смертність плодів до імплантації		Смертність плодів після імплантації		Загальна смертність, %	Кількість живих плодів, абс. (%)
				Абс.	%	Абс.	%		
Контроль	10	123	106	17	13,8	3	2,8	16,6	103 (97,16)
Діабет	18	214	179	35	16,3	16	8,93	25,23	163 (91,06)

Згідно даних табл. 3 індекс сперматогенезу, що відтворює збереження різних типів клітин сперматогенного епітелію, у сім'яниках щурів з експериментальним діабетом вірогідно знижувався порівняно з контролем. Популяція первинних клітин сперматогенезу також зазнала впливу діабетичного стану і саме за цих умов пригнічувалась мітогічна активність, а отже зменшувалась кількість сперматогоній в поперечних зрізах каналців сім'яників. Одночасно з цим

кількість клітин в 12-й стадії, що характеризує мейотичний поділ сперматоцитів I порядку, у сім'яниках щурів зі стрептозотоциновим діабетом знижувалась на 58%. Крім того, в сім'яних каналцях дослідних щурів спостерігались дегенеративні явища, які реєстрували за значним підвищенням випадків злуццювання сперматогенного епітелію в просвіт каналця, відшарування всієї маси клітин від базальної мембрани каналця та специфічних змін епітелію у вигляді „вікон”.

Табл. 3. Морфометричні показники стану сперматогенного епітелію у щурів зі стрептозотоциновим діабетом ($M \pm m$; $n=6$)

Показники	Групи самців	
	Контроль	Діабет
Індекс сперматогенезу	3,57 \pm 0,01	3,53 \pm 0,01*
Число сперматогоній	75,16 \pm 0,74	66,48 \pm 0,69*
12-та стадія мейозу, %	4,8 \pm 0,49	2,0 \pm 0,41*
Злуцений епітелій, %	1,2 \pm 0,58	2,75 \pm 1,11
Відшарування епітелію, %	0	1,5 \pm 0,65
Вікна, %	0	6,75 \pm 1,38

Існують свідчення, що у механізмах порушень репродуктивної функції тварин з експериментальним діабетом не останню роль відіграє оксидативний стрес, наприклад, показано, що у мишей зі стрептозотоциновим діабетом на ранній діабетичній фазі зростає рівень перекисного окислення ліпідів у епідидимальній спермі та сім'яниках (у цитозолі та міто-

хондріях). Там же спостерігали і значні зміни в активності антиоксидантних ферментів [8]. Авторами зроблено висновок, що за умов експериментального стрептозотоцинового діабету як на ранній, так і більш пізніх фазах оксидативний стрес може бути цілком або частково відповідальним за розвиток тесткулярної дисфункції [8]. Зважаючи на свідчення

індукції цитохрому СYP2E1 при стрептозотоциновому діабеті у печінці та інших органах (мозку, нирках та підшлунковій залозі) щурів [9], ми припустили, що даний феномен може бути однією з причин розвитку оксидативного стресу у сім'яниках. Порівняння відносної кількості мРНК СYP2E1 у сім'яниках щурів різних груп виявило зростання експресії даного ізозиму на 30% за умов стрептозотоцин-індукованого діабету (рис. 1). Здатність СYP2E1 генерувати активні форми кисню, такі як супероксидні радикали, що швидко взаємодіють із органічними молекулами з утворенням вторинних вільних радикалів, наразі є доведеним фактом [10]. Можливо, що за умов індукції СYP2E1 у сім'яниках, зростатиме ймовірність вільнорадикального ушкодження клітин Лейдига та/або їх мікрооточення, а це в свою чергу, викликати зниження секреції тестостерону та спричинитиме порушення функції Сертолі в кінцевому результаті порушуючи процес сперматогенезу [11].

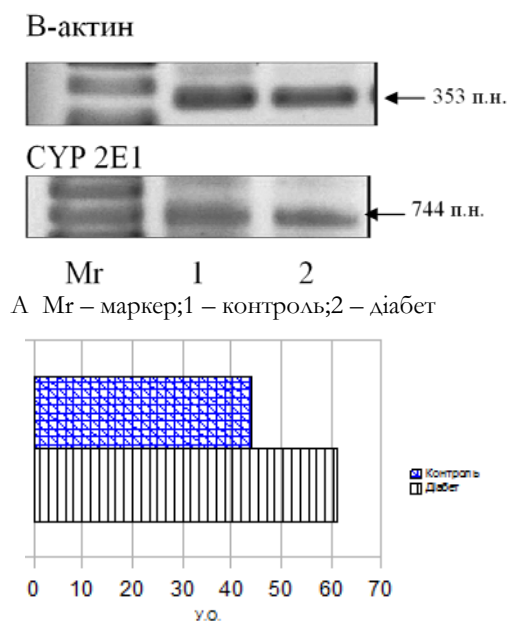


Рис. 1. А) електрофореграма продуктів ПАР гену СYP2E1 та референс-гену β -актину у сім'яниках щурів (стрілками вказано на відповідні ДНК-фрагменти); Б) відносний рівень експресії СYP2E1

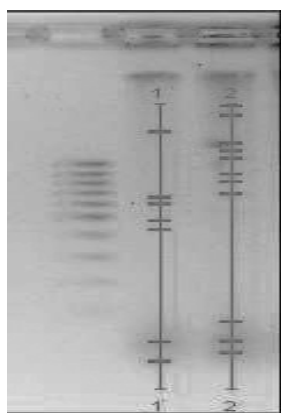


Рис. 2. Рівень фрагментації ДНК у сім'яниках щурів зі стрептозотоциновим діабетом (1 — контроль; 2 — діабет).

Крім того, оксидативні процеси у сім'яниках та епідідимальній спермі можуть бути асоційовані зі

значним підвищенням ушкодження ДНК. Нами показано (рис.2), що розвиток стрептозотоцинового діабету супроводжувався фрагментацією ДНК у сім'яниках з утворенням фракції, що містила фрагменти 20-30 п.о., а також широкого набору більш високомолекулярних фрагментів різної довжини.

У контролі високомолекулярна фракція ланцюжків ДНК була виражена значно меншою мірою. Відмінності у фрагментації ДНК контрольної та дослідної груп можуть бути спричинені відмінностями у активації різних наборів нуклеаз [12] та різною активністю вільно радикальних процесів [13].

Висновок: Отримані дані свідчать, що за умов стрептозотоцин-індукованого діабету відбувалось значне порушення репродуктивної здатності щурів-самців, очевидно, обумовлене порушенням сперматогенезу. Індукція СYP2E1 у сім'яниках, може мати певний внесок до патогенетичних механізмів розвитку чоловічої неплідності при діабеті, як шляхом підвищення генерації активних форм кисню та їхньої прямої дії на сперматогенний епітелій та ядерну ДНК статевих клітин, так і за рахунок опосередкованої дії на продукцію тестостерону.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification / D. Dobler, N. Ahmed, L. Song [et al.] // *Diabetes*. - 2006.-№7.- P.1961-1961.
2. Ramalho-Santos J. Diabetes and the Impairment of Reproductive Function: Possible Role of Mitochondria and Reactive Oxygen Species / J. Ramalho-Santos, S. Amaral, P. Oliveria // *Current Diabetes Reviews* - 2008.-V.4, №1. - P.46-54.
3. Роживанов Р.В. Состояние мужской репродуктивной функции при сахарном диабете / Р.В. Роживанов, Н.С. Парфенова, Д.Г. Курбатов // *Сахарный диабет*. - 2009. - №4. - С.21-22.
4. Renal microvascular changes in streptozotocin-induced, long-term diabetic rat / S. Sricharoenvej, Y. Tongpob, P. Lanula et al. // *J Med Assoc Thai*.- 2007. - V.90, №12. - P. 2677- 2782.
5. Principles and Methods of Toxicology, 4th edition. / Ed. By A. Wallace Hayes, 2001. - 1887 p.
6. Вплив протитуберкульозних засобів на біохімічні та функціональні показники стану гонад щурів самців Г.М. Шяхметова, Л.Б. Бондаренко, І.С. Блажчук, В.М. Коваленко // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. - 2011. - №6 (25). - С.35-40.
7. Lankford S.M. Cloning of Canine Cytochrome P-450 2E1 cDNA: Identification and Characterization of Two Variant Alleles / S.M. Lankford, S.A. Bai, J.A. Goldstein // *Drug Metab. Dispos.* - 2000. - V.28, №8. - P. 981-986.
8. Shrilatha B. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences / B. Shrilatha, A. Muralidhara // *Reprod. Toxicol.* - 2007. - №. 23(4). - 578-587.
9. Ahn T. Tissue-specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats T. Ahn, C.H. Yun, D.B. Oh // *Toxicol Lett.* - 2006. - №.166(1). - P.27-36.
10. Lieber C.S. Cytochrome P-4502E1: Its Physiological and Pathological Role / C.S. Lieber // *Physiol. Rev.* - 1997. - V.77. - P. 517-544.
11. Bonde J.P. Occupational risk to male reproduction / J.P. Bonde // *G. Ital. Med. Lav. Erg.* - 2002. - V.24, №2. - P. 112-117.
12. Apoptosis induced by a human milk protein / A. Hakansson, B. Zhivotovsky, Orrenius S. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1995. - V.92. - P.8064-8068.
13. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa/ R.J. Aitken, A.J. Koppers // *Asian. J. Androl.* - 2011. - V.13, №1. - P. 36-42.

Надійшла 14.06.2012 р.

Рецензент: проф. С.М.Смірнов