

Мелатонин как протектор ДНК сперматозоидов белых крыс

Галимов И.И.

Ульяновский государственный университет

Ряд нарушений репродуктивной функции может быть связан с повреждениями генетического материала развивающихся мужских половых клеток, которые носят либо стохастический характер (вследствие ошибок в работе ферментных систем репликации и репарации молекул ДНК), либо могут быть вызваны различными внешними причинами (физические и химические факторы). Их действие на ДНК, в основном, обусловлено образующимися активными формами кислорода и другими свободными радикалами [1].

Считается, что развивающиеся мужские половые клетки крайне чувствительны к повреждающим воздействиям, что обусловлено дефицитом в них антиоксидантов и систем восстановления структуры ДНК, причем способность мужских половых клеток самих генерировать свободные радикалы находится в обратной зависимости от их зрелости [2]. Поэтому изучение протекторных свойств мелатонина в невысоких, сопоставимых с физиологическими, концентрациях, в которых он может стимулировать активность генов антиоксидантных и репарационных систем [11], представляет практический интерес. Цель исследования - изучить роль мелатонина как протектора ДНК сперматозоидов белых крыс.

Материал и методы исследования.

Эксперимент был выполнен на 112 самцах беспородных белых крыс. По истечении 20 дневного адаптационного периода к 12 часовому режиму освещения (свет с 8-00 до 20-00), в течение двух недель до выведения из эксперимента, животные получали мелатонин в соответствии с 3 схемами: 1. круглосуточно, 2. в дневное время (с 8-00 до 20-00), 3. в ночное время (с 20-00 до 8-00). Мелатонин вводился с питьевой водой в течение 10 дней, в дозе 500 мкг/кг, в которой он оказывает не прямое антиоксидантное действие [12]. Выбор доз осуществляли на основе анализа данных литературы [13]. Выведение животных из эксперимента проводилось на 14-е сутки после начала введения мелатонина и осуществлялось под хлороформным наркозом в дневное и ночное время, в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 N 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Для исследования брались придатки семенников, которые помещались в фосфатно-солевой буферный раствор (pH=7,4) с 5 % диметилсульфоксидом, проходили ступенчатую заморозку и хранились до завершения эксперимента при $t = -25^{\circ}\text{C}$. Для определения количества повреждений ДНК была выбрана методика «Comet assay» - чувствительная методика гель-электрофореза, подходящая для использования на различных типах клеток, в том числе, с небольшой модификацией, для сперматозоидов [3,9]. Индекс поврежденных клеток рассчитывался в случайных выборках, как отношение количества найденных комет к сперматозоидам без повреждений. Найденные кометы фотографировались, на каждом слайде анализировалось по 100 клеток. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием критерия Манна-Уитни для попарного сравнения групп с контролем, уровень значимости отличий был выбран $p=0,05$.

Результаты исследования

1. Доля сперматозоидов, экспрессирующих общее количество повреждений ДНК (1- и 2- нитевых разрывов ДНК, а также щелочно-лабильные сайты) в виде «ДНК-комет».

Ведение мелатонина в дневное и ночное время привело к снижению ($P<0,05$) доли сперматозоидов с общим количеством повреждений ДНК. Однако при введении мелатонина круглосуточно, достоверного снижения доли поврежденных клеток не наблюдалось. Такой эффект может быть связан с циркадианной динамикой повреждений ДНК [10]. Установлено, что сигналинг повреждений ДНК и NER- репарационный механизм находятся под управлением циркадианных часов клетки [5,6]. Поскольку мелатонин усиливает экспрессию генов некоторых антиоксидантных ферментов [10], и такое действие может иметь дозозависимый характер [4], то, следовательно, протекторного эффекта с большей вероятностью можно ожидать в группах с ночной фиксацией биоматериала. В это время действие эндогенного мелатонина усиливается влиянием экзогенного, что подтверждается результатами нашего исследования. При введении мелатонина круглосуточно как в дневном, так и в ночном выведении животных из эксперимента достоверных отличий не было, но наблюдалась тенденция к снижению количества поврежденных клеток. При введении мелатонина в ночное время он оказывает более выраженный протекторный эффект, по сравнению с его введением в дневное время и круглосуточно.

2. Доля сперматозоидов, экспрессирующих 2-нитевые повреждения ДНК в виде «ДНК-комет».

При дневном выведении животных из эксперимента, введение мелатонина не привело к достоверному ($P < 0,05$) изменению доли сперматозоидов с 2-нитевыми разрывами ДНК по сравнению с контролем. Наблюдаемые изменения являются лишь стохастическими флуктуациями. При ночном выведении животных из эксперимента, введение мелатонина вечером привело к снижению ($p < 0,05$) уровня 2-нитевых повреждений ДНК по сравнению с контролем. Введение мелатонина при других схемах такого влияния не оказало.

3. Доля сперматозоидов, экспрессирующих окислительные повреждения ДНК (окисленные пуриновые основания, вырезаемые эндонуклеазой III) в виде «ДНК-комет».

При дневном выведении из эксперимента снижение количества клеток с повреждениями отмечалось при введении мелатонина утром и вечером по сравнению с контролем. При ночном выведении животных из эксперимента, мелатонин снижал количество сперматозоидов с окисленными пуринами во всех группах, в которых он вводился, при всех способах введения (утром, вечером и круглосуточно). Наиболее выраженное протекторное действие мелатонина отмечено в отношении окислительных повреждений ДНК (отличия с контролем присутствуют в наибольшем количестве групп), которые рассмотрены на примере окислительно-модифицированных пуриновых оснований, что выявлялось как при дневной, так и при ночной фиксации биоматериала, но более отчетливо было выражено при ночной фиксации семенников. Наименьший протекторный эффект был зафиксирован в отношении 2-нитевых разрывов ДНК сперматозоидов крыс (отсутствие эффекта и достоверных различий при дневной фиксации и 1 достоверное отличие при ночной фиксации семенников).

Таким образом, данные эксперимента подтверждают впервые появившиеся в 2000 годах сведения о наличии у мелатонина не прямых протекторных свойств, которые, в отличие от прямых антиоксидантных свойств, могут проявляться при введении в низких физиологических концентрациях и связаны, в основном, с регуляцией экспрессии генов ферментов антиоксидантной системы [11]. При изучении уровня мРНК 3 ферментов антиоксидантной системы клеток тканей мозга: глутатионпероксидазы, Cu, Zn-зависимой супероксиддисмутазы, а также Mn-зависимой супероксиддисмутазы было выявлено, что введение мелатонина в более низкой дозе (50 мкг/кг) вызывало почти в 4 раза большее увеличение относительного уровней мРНК ферментов, чем введение мелатонина в

высокой дозе (500 мкг/кг). Также показано, что при введении мелатонин в высокой дозе, он оказывает примерно одинаковое действие на уровень мРНК как при остром, так и при хроническом введении [8].

Немногочисленные работы, посвященные оксидативному стрессу в семенниках [7], не позволяют однозначно судить о специфике действия мелатонина. Полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии тканеспецифического протекторного действия низких концентраций мелатонина, а также о разной степени выраженности его действия в отношении различных типов повреждений ДНК. Наиболее выраженный протекторный эффект мелатонин оказывал в отношении окислительных повреждений ДНК сперматозоидов белых крыс.

Литература:

1. Черников А.В. Кислородный эффект при тепловых повреждениях ДНК / А.В. Черников и др. // Биофизика. - 2007. - Т. 52, вып. 2. - С. 244-251.
2. Aitken R.J. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease / R.J. Aitken, M.A. Baker, D. Sawyer // Reproductive Biomedicine Online. - 2003. - Vol. 7, Issue 1. – P. 65-70. - ISSN 14726483.
3. Azqueta A. DNA Repair Measured by the Comet Assay / A. Azqueta, S. Shaposhnikov, A. R. Collins // DNA Repair, Publisher InTech. - 2011. - P. 615-636. - ISBN 978-953-307-697-3.
4. Melatonin Anticancer Effects: Review / G. Di Bella et. al. // International Journal of Molecular Sciences. - 2013. - № 14. - P. 2410-2430. - ISSN 1422-0067.
5. Jackson S. P. The DNA-damage response in human biology and disease / S. P. Jackson, J. Bartek // Nature. - 2009. - Vol. 461. - P. 1071-1078. - ISSN 1476-4687.
6. Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain / T.H. Kang, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. - Vol. - 106. - P. 2864-2867.
7. Combined effects of Vitamin E and Vitamin C supplementation on cadmium induced testicular morphology and oxidative stress / R.D. Kini et al. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2011. - Vol. 2, Issue 4. - P. 27-34. - ISSN: 0975-8585.
8. Okatani Y. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain / Y. Okatani, A. Wakatsuki, C. Kaneda // Journal of Pineal Research. - 2000. - Vol. 28. - P. 89-96.
9. Peggy L. O. The comet assay: a method to measure DNA damage in

individual cells / L. O. Peggy, J. P Banáth // Nature Protocols. - 2006. - Vol. 1. - P. 23-29.

10. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways / L. Ran et al. // Cell Biology. - 2013. - Vol. 14, № 1. - P. 1-8.

11. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans/ R.J. Reiter et. al. // Acta Biochemica Polonica. - 2003. - Vol. 50, № 4. - P. 1129-1146.

12. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin / C. Rodriguez et. al. // Journal of Pineal Research. - 2004. - Vol. 36. - P. 1-9.

13. Chemotherapeutic agents doxorubicin and epirubicin induce a procoagulant phenotype on endothelial cells and blood monocytes / L.L. Swystun et. al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. - 2009. - Vol. 7. - P. 619-626.